

Expression von Enzymen für die Synthese und die Degradierung von Katecholaminen in Immunzellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Sina Mollérus

aus Mönchengladbach
April 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Harald Engler

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

3. Gutachter: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bernd Sures

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2013

„Die Dinge sind nicht immer das, was sie zu sein scheinen, der erste Eindruck täuscht viele.
Und nur die Klugheit einiger weniger nimmt wahr, was so gründlich verborgen schien.“
Phaedrus

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	ix
Abbildungsverzeichnis	xii
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	13
1.1 Das Immunsystem	13
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	13
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	2
1.1.2.1 Milz	3
1.1.2.2 Lymphozyten	3
1.2 Bidirektionale Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem	5
1.2.1 Afferenter Arm	5
1.2.2 Efferenter Arm	7
1.2.3 Adrenozeptoren auf Lymphozyten	9
1.2.4 Katecholamine	10
1.2.4.1 Katecholaminsynthese	11
1.2.4.2 Katecholamindegradierung	12
1.2.5 Adrenerge Einflüsse auf die Funktion von Immunzellen	14
1.2.6 Adrenerge Einflüsse auf die Immunantwort	15
1.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	1
2.1 Tiere und Tierhaltung	1
2.2 Viren und Zelllinie	1
2.3 Chemikalien	1
2.4 Lösungen, Puffer und Medien	19
2.5 Biochemikalien, Antikörper, Oligonukleotide und Sonden	19
2.6 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	23
2.7 Zellbiologische Methoden	24
2.7.1 Tötung der Versuchstiere und Entnahme von Organen	24
2.7.2 Isolierung von murinen Leukozyten der Milz	24
2.7.3 Isolierung von peripheren humanen PBMCs aus dem Vollblut	24
2.7.4 Prinzip der immunomagnetischen Selektion	25
2.7.5 Stimulation des T-Zell Rezeptors	26
2.7.6 Nachweis infektiöser Zellen mit dem <i>Infectious Center Assays</i>	26
2.7.7 Durchflusszytometrie	27
2.7.7.1 Färbung von Oberflächenmarkern	27

2.7.7.2 Färbung intrazellulärer Proteine.....	28
2.7.7.2.1 Granzym B und Foxp3 Färbung.....	28
2.7.7.2.2 IFN- γ , TNF- α und IL-2 Färbung.....	28
2.7.7.2.3. Tetramerfärbung.....	29
2.8 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.8.1 Isolierung der Gesamt-RNA.....	30
2.8.2 Reverse Transkription	30
2.8.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	30
2.8.3.1 Ermittlung der geeigneten Primer- und Sondenkonzentrationen	30
2.8.3.2 Durchführung der qPCR.....	31
2.9 Neurochemische Methoden.....	32
2.9.1 Analytischer Nachweis von Noradrenalin.....	32
2.9.1.1 HPLC mit elektrochemischer Detektion	33
2.10 Tierexperimentelle Methoden	33
2.10.1 Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus.....	33
2.10.2 Chemische Sympathektomie	34
3 Ergebnisse	24
3.1 Etablierung der qPCR - Vergleich der Expression von Referenzgenen -	24
3.2 Charakterisierung der konstitutiven mRNA-Expression von Enzymen für Katecholaminsynthese und-abbau	36
3.2.1 Enzymexpression in Leukozyten	37
3.2.2 Überprüfung der qPCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.2.3 Enzymexpression in Leukozytensubpopulationen	38
3.2.4 Vergleich der Enzymexpression in verschiedenen Geweben	39
3.2.5 Zusammenfassung der konstitutiven Enzymexpression	40
3.3 Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels in aktivierten Immunzellen ..	41
3.3.1 Expressionskinetik in Milzleukozyten	41
3.3.2 Expressionskinetik in murinen T- und B-Lymphozyten.....	42
3.3.3 Einfluss einer T-Zellaktivierung auf die intrazelluläre Noradrenalinkonzentration	44
3.3.4 Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A in aktivierten Leukozyten.....	44
3.3.5 Expressionskinetik in humanen T-Lymphozyten.....	46
3.3.6 Zusammenfassung Immunaktivierung und Enzymexpression.....	47
3.4 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes einer Friend Virus-Infektion	48
3.4.1 Milzgewicht im Verlauf einer FV-Infektion	48
3.4.2 Enzymexpression im Verlauf einer FV-Infektion.....	49
3.4.3 Noradrenalinkonzentration im Milzgewebe im Verlauf einer FV-Infektion	51

3.5.4 Zusammenfassung Kinetik der FV-Infektion.....	51
3.5 Charakterisierung des Einflusses einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion	52
3.5.1 NoradrenalinKonzentration in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen	52
3.5.2 Milzgewicht und Viruslast in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen.....	53
3.5.3 Enzymexpression in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen	54
3.5.4 Anzahl zytokinproduzierender T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen	55
3.5.5 Funktion von CD8 ⁺ T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen	56
3.5.6 Expansion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten... Mäusen	57
3.5.7 Zusammenfassung der Einflussnahme einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion.....	58
4 Diskussion	35
4.1 Konstitutive Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen. beteiligten Enzyme	35
Enzymexpression in Milzleukozyten	35
Enzymexpression in verschiedenen Leukozytensubpopulationen	62
Vergleich der Enzymexpression in Geweben und Milzleukozyten	63
4.2 Auswirkung einer Zellaktivierung auf die Enzymexpression	63
Enzymexpressionskinetik in Milzleukozyten.....	63
Enzymexpressionskinetik in murinen T- und B-Lymphozyten	64
Auswirkung einer T-Zellaktivierung auf die intrazelluläre NoradrenalinKonzentration .	65
Auswirkung einer Calcineurininhibition auf die Enzymexpression	65
Enzymexpression in humanen T-Lymphozyten.....	66
4.3 Untersuchungen zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes einer FV-Infektion ...	67
Charakterisierung des Verlaufes einer FV-Infektion anhand des Milzgewichtes.....	67
Enzymexpression im Verlauf einer FV-Infektion.....	68
NoradrenalinKonzentration im Verlauf einer FV-Infektion	68
4.4 Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion	69
Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf das Milzgewicht und die Viruslast	69
Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Enzymexpression...	70
Einfluss auf zytokinproduzierenden T-Lymphozyten.....	70
Einfluss auf die Effektorfunktion von T-Zellen.....	71
Expansion von T _{regs}	71
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	72
5 Zusammenfassung.....	60
5.1 Zusammenfassung.....	60

6 Literaturverzeichnis.....	75
------------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hdroxydopamin
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
ADR	Adrenalin
AF	Alexa Fluor
AF700	Alexa Fluor 700
ANS	autonomes Nervensystem
APC	Antigen-presenting cell
APC	Allophycocyanin
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
AR	adrenerger Rezeptor
β_1 -AR	beta-1 Adrenozeptor
β_2 -AR	beta-2 Adrenozeptor
Bp	Basenpaare
BCR	B cell receptor
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serum Albumin
BH4	Tetrahydrobiopterin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
COMT	Catechol-N-Methyl-Transferase
Con-A	Concanavalin A
CsA	Cyclosporin A
CTL	cytotoxic T lymphocyte
CT	Cycle Threshold
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
DC	Dendritic cell
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
env	envelope (Virushülle)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FFU	focus forming units
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
F-MuLV	Friend Murines Leukämievirus
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FP	Forward primer
FSC	forward scatter
FV	Friend Retrovirus
gag	Gruppenspezifische Antigene
gp	Glykoprotein
GPCR	G-protein-coupled receptor
GTC	Guanidinisothiocyanat

GzmB	Granzym B
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPA-Achse	Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horse radish peroxidase
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
iT _{regs}	induzierte regulatorische T-Zellen
i. v.	intravenous
Kb	Kilobase
LCMV	Lymphozytäre Choriomenigits-Virus
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic cell sorting
MAO	Monoaminoxidase
MHC	Major Histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MuLV	Murines Leukämievirus
NA	Noradrenalin
NAT	Noradrenalintransporter
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nT _{regs}	natürliche Regulatorische T-Zellen
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PI	Propidiumjodid
Pit-1/2	inorganic phosphate transporter
PNMT	Phenyl-N-Methyltransferase
PRR	pattern recognition receptor
qPCR	quantitative PCR
ROS	Reactive Oxygen Species
RP	Reverse Primer
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RPMI	Roswell Park Memorial Insitute 1640
S	Sonde (Taqman)
SEM	standard error of the mean
SFFU	spleen focus forming units
SFFV	spleen focus forming virus
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SSC	sideward scatter
SNS	sympathisches Nervensystem
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	Taq-Polymerase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TCR	T cell receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
TH	Tyrosinhydroxylase
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Innervation der lymphatischen Organe	8
Abbildung 2: Mögliche Wege der bidirektionalen Kommunikation zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Immunsystem	9
Abbildung 3: Synthese von Katecholaminen	12
Abbildung 4: Degradierung von Katecholaminen	14
Abbildung 5: Verlauf der Standardkurve für die absolute Quantifizierung der qPCR	32
Abbildung 6: Vergleich der Expression der Referenzgene GAPDH und β -Aktin in Leukozyten, Nebenniere und Hirnstamm	36
Abbildung 7: Versuchsablauf der RNA-Expressionsanalyse in murinen Leukozyten der Milz	37
Abbildung 8: Konstitutive Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme in isolierten Leukozyten	37
Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels	38
Abbildung 10: : Konstitutive Expression der Enzyme für Synthese und Degradierung von Katecholaminen in isolierten Leukozytenpopulationen	39
Abbildung 11: Konstitutive Expression der Enzyme für die Synthese und Degradierung von Katecholaminen in Milzleukozyten, Hirnstamm und Nebennieren	40
Abbildung 12: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD40/anti-IgM F(ab') ₂ mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A	42
Abbildung 13: Effekte von anti-CD40/anti-IgM F(ab') ₂ mAK auf die Expression von COMT und MAO-A in murinen B-Zellen	43
Abbildung 14: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD28 mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A in isolierten murinen T-Zellen	43
Abbildung 15: Effekte einer anti-CD3 mAK-Stimulation auf die Noradrenalkonzentration in isolierten Leukozyten der Milz	44
Abbildung 16: Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A in T-Zell-aktivierten Leukozyten der Milz	45
Abbildung 17: Einfluss einer <i>in-vitro</i> -T-Zellstimulation auf die Genexpression der an der Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme in humanen zirkulierenden T-Lymphozyten	46
Abbildung 18: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD28 mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A in humanen zirkulierenden T-Zellen	47
Abbildung 19: Versuchsablauf zur Untersuchung einer FV-Infektion	48
Abbildung 20: Veränderungen des Milzgewichtes im Verlauf einer FV-Infektion	49

Abbildung 21: Expression der Enzyme für die Synthese und die Degradierung von Katecholaminen in Leukozyten während einer akuten FV-Infektion	50
Abbildung 22: Auswirkungen des Verlaufes einer FV-Infektion auf die NoradrenalinKonzentration im Milzgewebe	51
Abbildung 23: Versuchsablauf zur Untersuchung der Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf den Verlauf der FV-Infektion	52
Abbildung 24: Einfluss einer sympathischen Sympathektomie auf die NoradrenalinKonzentration im Milzgewebe von FV-infizierten Mäusen	53
Abbildung 25: Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die Milzgröße und Anzahl der infektiösen Zellen in FV-infizierten Mäusen	54
Abbildung 26: Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme	55
Abbildung 27: Auswirkung einer sympathischen Sympathektomie auf die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α	56
Abbildung 28: Auswirkung einer sympathischen Sympathektomie auf FV-induzierte Granzym B-Expression und Tetramer-Expression in CD8 ⁺ T-Lymphozyten	57
Abbildung 29: Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die Expansion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	19
Tabelle 2: Verwendete Standardkits	19
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	20
Tabelle 4: Verwendeten Oligonukleotide und Sonden	22
Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte	23
Tabelle 6: Ermittelte Endkonzentrationen der verwendeten Primer und Sonden	24
Tabelle 7: Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A	46

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, das den Organismus vor Pathogenen wie Viren oder Bakterien, sowie vor malignen, entarteten Körperzellen schützt und beschädigtes Gewebe entfernt und erneuert (Janeway, 2002; Raison *et al.*, 2002; Hoebe *et al.*, 2004). Bereits Invertebraten besitzen unspezifische Rezeptoren zur Erkennung körperfremder Strukturen (Muller *et al.*, 2008). Während der Phylogenese entwickelten höhere Vertebraten neben dem angeborenen Immunsystem auch ein adaptives Immunsystem, welches spezifische Strukturen von Pathogenen erkennt. Durch gezielte zelluläre Mechanismen können Pathogene abgewehrt werden (Cooper *et al.*, 2006). Auch wenn sich beide Komponenten der Abwehr in ihren Rezeptoren sowie ihren Abwehrmechanismen unterscheiden (Medzhitov, 2007), ist eine Interaktion beider Systeme essenziell, um einen optimalen Schutz des Organismus zu gewährleisten.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die ersten Barrieren, die ein Pathogen überwinden muss, sind anatomischer und physiologischer Art. Anatomische Barrieren sind Haut und Schleimhäute. Die Magensäure und das Lysozym des Speichels fungieren als physiologische Barriere und verhindern so das Wachstum von Mikroorganismen (Ouellette, 2004). Überwinden Pathogene diese „*first line of defense*“, werden die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems als erste aktiv. Dieses System ist evolutionär älter und vor allem durch seine schnelle Einsatzbereitschaft gekennzeichnet (Kimbrell *et al.*, 2001, Raison *et al.*, 2002). Es verfügt über weitere Ressourcen, um eingedrungene Erreger zu bekämpfen. Hierzu gehören beispielsweise diverse Zelltypen wie Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DC), natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Monozyten und Mastzellen. Aber auch lösliche Komponenten, zu denen die Zytokine zählen oder das Komplementsystem, können eine aufkeimende Infektion bekämpfen (Frank *et al.*, 1991) und sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems (Beutler, 2004).

Eine erfolgreiche Aktivierung der angeborenen Immunität setzt eine gezielte Erkennung der eingedrungenen Pathogene voraus. Für diese Erkennung existieren Rezeptoren, sogenannte „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR) (Kimbrell *et al.*, 2001; Gordon, 2002), welche hochkonservierte molekulare Strukturen, die sogenannten „*pathogen associated molecular patterns*“ (PAMPs) erkennen. Diese Strukturen sind einzigartig für Mikroorganismen (Janeway *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Zu den PAMPs zählen Zellwandbestandteile wie das Pepti-

doglycan oder das Lipopolysaccharid (LPS), aber auch bestimmte nicht methylierte DNA-Sequenzen, die nur bei Bakterien vorkommen (CpG-Oligonukleotide).

Ein wichtiger Vertreter dieser PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen, Mastzellen, DC und Granulozyten sowie im Endosom vorkommen (Takeda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Fleer *et al.*, 2007). Im murinen System werden 13 TLRs (TLR1-13) exprimiert, wobei TLR10 nicht funktionell ist (Takeda *et al.*, 2005; Akira *et al.*, 2006; Browne 2012). Beim Menschen sind bisher nur 11 Vertreter bekannt (TLR1-11); TLR11 ist ebenfalls nicht funktionstüchtig (Takeda *et al.*, 2005; Akira *et al.*, 2006). Erkennt ein TLR den jeweiligen Liganden, so wird eine Signalkaskade angestoßen, in deren Verlauf der Transkriptionsfaktor NF- κ B (engl. „*nuclear factor 'kappa-light-chain enhancer' of activated B-cells*“) aktiviert wird. Dieser transloziert in den Zellkern, um dort die Expression von proinflammatorischen Zytokinen zu induzieren (Seger *et al.*, 1995; Akira *et al.*, 2004; Iwasaki *et al.*, 2004).

Zu den Zytokinen gehören auch Chemokine, welche eine chemotaktische Wirkung auf andere Immunzellen besitzen (Fernandez *et al.*, 2002). Chemokine werden von Immunzellen wie DC und Makrophagen freigesetzt. Zusammen mit B-Lymphozyten, Monozyten und fast allen kernhaltigen Körperzellen gehören die DC und Makrophagen zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC). Ein Kennzeichen dieser APCs ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. „*major histocompatibility complex*“, MHC) der Klasse I und Klasse II. Über diese Komplexe werden Peptide der Pathogene auf der Zelloberfläche präsentiert, um so eine Immunerkennung durch das adaptive Immunsystem, hauptsächlich den T-Lymphozyten, induzieren zu können (Banchereau *et al.*, 1998; Steinman *et al.*, 2006). MHC-I präsentiert vor allem Antigene, die von den Zellen selbst produziert werden; nach einer Infektion zählen dazu auch virale Proteine. MHC-I wird auf allen kernhaltigen Zellen, wie beispielsweise Hepatozyten oder Nierenzellen, exprimiert (Janeway, 2005). MHC-II hingegen wird nur auf DC, Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Anders als das angeborene Immunsystem, das sich vor allem durch seine schnelle Einsatzbereitschaft auszeichnet, ist das adaptive Immunsystem insbesondere durch seine Spezifität gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen charakterisiert (Raison *et al.*, 2002). Das adaptive Immunsystem setzt sich aus den spezialisierten Immunzellen, den Lymphozyten sowie primären und sekundären lymphatischen Organen zusammen. Zu den primären lymphatischen Organen gehören das Knochenmark und der Thymus. In ihnen entstehen und reifen die Im-

munzellen. Die Lymphknoten und die Milz zählen zu den sekundären lymphatischen Organen. In ihnen wird die Immunantwort induziert (Janeway, 2002).

1.1.2.1 Milz

Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich mit Leukozyten der Milz gearbeitet wurde, soll die Milz im Folgenden kurz näher beschrieben werden.

Als größtes sekundäres lymphatisches Organ nimmt die Milz eine wichtige Rolle sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität ein (Balogh *et al.*, 2004). Anatomisch gesehen liegt das kapsuläre Organ im linken Oberbauch, unterhalb des Zwerchfelles und oberhalb der linken Niere (Steiniger *et al.*, 2000). Morphologisch sowie funktionell setzt sich das Milzgewebe aus der roten und weißen Pulpa zusammen (Saito *et al.*, 1988). Die rote Pulpa ist der Blutfilter, welcher defekte oder alte Erythrozyten aus dem Blut herausfiltert, die dann durch Makrophagen abgebaut werden (Cesta, 2006). Die weiße Pulpa gehört zum Immunsystem. Sie umfasst die Äste der Milzarterie und formt so die periarterielle lymphatische Scheide (PALS), die hauptsächlich T-Lymphozyten enthält (Saito *et al.*, 1988). Zwischen der weißen und der roten Pulpa liegt die Marginalzone, welche hauptsächlich B-Lymphozyten aufweist.

1.1.2.2 Lymphozyten

Als Zellen der adaptiven Immunantwort sind Lymphozyten in der Lage, Pathogene über spezifische Antigene zu erkennen und gezielt abzuwehren. Die Lymphozyten lassen sich in zwei Hauptgruppen, die T- und B-Zellen, mit jeweils unterschiedlichen Antigenrezeptoren einteilen. Diese Zellen können sowohl eine Effektorfunktion als auch eine Gedächtnisfunktion besitzen (Nappi *et al.*, 2000). Die Gedächtniszellen (engl. „*Memory-cells*“) sind ruhende T- und B-Lymphozyten und werden nach dem Erstkontakt mit einem Antigen gebildet (Janeway *et al.*, 2002). Sie verhindern eine erneute Infektion mit dem gleichen Pathogen und gewährleisten so eine lang anhaltende Immunität.

Die B-Zellen entstehen direkt aus einer hämatopoetischen Stammzelle. Die Stammzelle ist sowohl beim Menschen als auch bei adulten Mäusen im Knochenmark angesiedelt (Cumano *et al.*, 2007), während die T-Zellen vom Knochenmark bzw. von der fötalen Leber in den Thymus wandern und dort ausreifen (Janeway *et al.*, 2002; Allman *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2008).

Lymphozyten lassen sich morphologisch nicht voneinander unterscheiden. In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungs- oder Differenzierungszustand exprimieren sie ein für sie selbst spe-

zifisches Profil an Oberflächenmolekülen. Durch diese Glykoproteine, die sogenannten „*cluster of differentiation*“ (CD), lassen sich Lymphozyten in unterschiedliche Subpopulationen einteilen. Diese Glykoproteine gehören zur Immunglobulinsuperfamilie (Parnes, 1989).

B-Lymphozyten werden über CD19 identifiziert und erkennen Antigene über sogenannte Immunglobuline (Ig). Die Immunglobuline können sowohl als membrangebundene Rezeptoren (B-Zellrezeptor, BCR) als auch als sezernierte Antikörper produziert werden. Die Aktivierung der B-Zellen findet in lymphoiden Geweben statt. Dort bindet ein Antigen an den BCR und löst so die Signaltransduktion aus. Die Antigene werden degradiert und in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche über MHC-II präsentiert (Janeway, 2005). Die Aktivierung der B-Zellen benötigt zusätzlich noch antigenspezifische T-Helferzellen, die den Komplex aus Peptid und MHC-II erkennen (Janeway, 2005). Dadurch werden die B-Zellen durch die Bindung von CD40 Ligand an CD40 Rezeptor stimuliert und es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen (Noelle *et al.*, 1992). Als Folge der Aktivierung proliferieren und differenzieren sich die klonal expandierten B-Zell-Nachkommen in antikörpersezernierende Plasmazellen oder „*B-Memory cells*“. Die von der Plasmazelle sekretierten löslichen Antikörper dienen der Opsonierung von Pathogenen; darüber hinaus aktivieren sie das Komplementsystem oder neutralisieren Antigene. Dadurch wird eine humorale Immunantwort ausgelöst und die Ausbreitung von intrazellulären Infektionen verhindert.

Ein charakteristischer Oberflächenmarker zur Unterscheidung von T- und B-Lymphozyten ist CD3 (Raison *et al.*, 2002). Innerhalb der T-Zellen kann weiter zwischen zwei Hauptpopulationen unterschieden werden: den CD4⁺- und den CD8⁺ T-Zellen (Raison *et al.*, 2002). Diese Glykoproteine dienen als Korezeptoren des T-Zellrezeptors (TCR; Murphy *et al.*, 2002; Raison *et al.*, 2002).

Naive T-Zellen treten in den Blutstrom ein und zirkulieren dort bis zu den lymphoiden Organen in der Peripherie. In den lymphoiden Organen treffen sie ihr spezifisches Antigen (Mackay *et al.*, 1990). Zur Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Zellen werden die Präsentation der spezifischen Antigene über die MHC-Moleküle sowie bestimmte kostimulatorische Signale benötigt. Die CD8⁺-T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu cytotoxischen T-Zellen (CTLs) und erkennen Peptide, die ihnen von APC über MHC-I präsentiert werden, über ihren TCR (Raison *et al.*, 2002). Die Hauptaufgabe dieser Zellen ist die Eliminierung infizierter Zellen durch zytotoxische Proteine wie z. B. Granzyme und Perforine (Zinkernagel *et al.*, 1974; Parnes, 1989; König *et al.*, 1992).

Das CD4-Molekül befindet sich üblicherweise auf T-Helferzellen. Die T-Helferzellen können die Funktion von Immunzellen, z. B. den B-Zellen, regulieren (Raison *et al.*, 2002). Die CD4⁺-T-Zellen erkennen über ihren TCR Antigen-Peptide, die über MHC-II präsentiert wer-

den (Konig *et al.*, 1992; Raison *et al.*, 2002). Die $CD4^+$ T-Zellen können sich in drei verschiedene Arten von T-Helferzellen entwickeln: Th1, Th2 und Th17. Diese unterscheiden sich durch ihre Funktion und ihre unterschiedliche Zytokinsekretion (Reinhardt *et al.*, 2006). Ebenso können sich die $CD4^+$ in regulatorische T-Zellen (T_{regs}) entwickeln.

Immunreaktionen können lebensrettend sein, wenn sie zielgerichtet und erfolgreich gegen Krankheitserreger oder entartete Körperzellen vorgehen. Sie können aber auch lebensbedrohlich werden, wenn sie außer Kontrolle geraten, wie z. B. bei Autoimmunreaktionen, oder sich im Laufe der Infektion verselbstständigen (z. B. Sepsis). Daher ist eine Kontrolle der Immunreaktionen erforderlich. Die Kontrolle leistet das Immunsystem zum einen selbst durch die Selektion von autoreaktiven Immunzellen, zum anderen erfolgt darüber hinaus eine Kontrolle durch das zentrale Nervensystem (ZNS) mittels der Ausschüttung von Stresshormonen und Neurotransmittern (Raison *et al.*, 2002).

1.2 Bidirektionale Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem

Lange Zeit galt das Immunsystem aufgrund von *in-vitro*-Befunden sowie der Beobachtung autoregulatorischer Immunprozesse als autonom. Eine Regulation des Immunsystems durch andere Systeme wie z. B. das ZNS oder das endokrine System schienen unwahrscheinlich, da eine physiologische Verbindung zwischen Gehirn und der aktivierten immunkompetenten Zelle kaum vorstellbar war. Interdisziplinäre Forschungen der letzten Jahrzehnte lieferten jedoch die Belege für eine enge funktionale Kommunikation zwischen ZNS und Immunsystem. Dabei reguliert das ZNS einerseits Körperabwehrprozesse, wird aber andererseits auch durch Botenstoffe des Immunsystems beeinflusst (Ader *et al.*, 1991). Die Kommunikation der Systeme erfolgt bidirektional (Felten *et al.*, 1991; Weihe *et al.*, 1991; Ader *et al.*, 1993; Felten *et al.*, 1994; Besedovsky *et al.*, 1996) über afferente (vom Immunsystem zum ZNS) und efferente (vom ZNS zum Immunsystem) Wege. Die komplexe Interaktion zwischen dem ZNS und dem Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichtes (Wilder, 1995; Schorr *et al.*, 1999).

1.2.1 Afferenter Arm

Die ersten Hinweise auf einen Kommunikationsweg vom Immunsystem zum ZNS wurden von Besedovsky und Kollegen publiziert (Besedovsky *et al.*, 1975). Im Zuge einer Immunantwort sezernieren aktivierte Immunzellen Zytokine (Besedovsky *et al.*, 1979; Besedovsky *et al.*, 1981; Besedovsky *et al.*, 1983; Besedovsky *et al.*, 1986). Die Zytokine stimulieren die

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (engl. „Hypothalamic-pituitary-adrenal axis“, HPA-Achse) sowie das Sympathische Nervensystem (SNS) und vermitteln darüber hinaus ein Muster an physiologischen, psychologischen und behavioralen Veränderungen, die unter dem Begriff „Krankheitsverhalten“ zusammengefasst werden (Kelley *et al.*, 2003; Seruga *et al.*, 2008).

Das Fieber ist die wichtigste und bekannteste physiologische Begleiterscheinung der Abwehr; die erhöhte Körpertemperatur beeinflusst die Funktion der Immunzellen positiv (Blatteis, 2000). So wird beispielsweise das Wachstum der meisten Bakterien gehemmt. Durch den erhöhten Energiebedarf ist der Organismus aber darauf angewiesen, an anderer Stelle Energie einzusparen. Nach einer Injektion von Zytokinen wurden im Tierversuch eine Verminderung der Nahrungsaufnahme, der Aktivität und des sozialen Verhalten beobachtet. Es wird vermutet, dass dies zur Energieeinsparung dient (Dantzer *et al.*, 2001).

Zytokine können aufgrund ihrer Größe und hydrophilen Eigenschaft die Blut-Hirn-Schranke nicht direkt passieren. Seit längerem werden verschiedene Wege, über die Zytokine ins Gehirn gelangen und dort afferente Signale vermitteln, diskutiert (Turnbull *et al.*, 1999). Ein möglicher Weg, wie Zytokine eine direkte Wirkung auf das Gehirn ausüben könnten, ist im Bereich einer durchlässigen Blut-Hirn-Schranke zu finden (Quan *et al.*, 1998). Eine nicht vollständig ausgebildete Blut-Hirn-Schranke ist bei den zirkumventrikulären Organen und im *Plexus chorioideus* anzutreffen (Turnbull *et al.*, 1999). Zytokine können aber auch über selektive Transportmechanismen durch die Zellen der Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen (Banks *et al.*, 2006). Es wurde auch die Möglichkeit diskutiert, dass Zytokine erst gar nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren müssen. Zytokine induzieren die Produktion von Intermediärprodukten (z. B. Prostaglandine durch IL-1) an der Blut-Hirn-Schranke, woraufhin sie diese passieren und so Effekte am Zielort einleiten können (de Vries *et al.*, 1995). Diese humorale Signaltransduktion verläuft sehr langsam; daher ist ein zweiter, schnellerer Weg für die Signalweiterleitung essenziell. Es wird angenommen, dass Zytokine in der Peripherie afferente Signalwege indirekt über neuronale Wege ins Gehirn leiten. An diesem neuronalen Weg sind die sensiblen Anteile des *Nervus vagus* sowie abdominale Paraganglien, die in der Nachbarschaft zu zytokinproduzierenden Zellen zu finden sind, beteiligt (del Rey *et al.*, 2007). Der Vagus leitet die peripheren Entzündungssignale an den *Nucleus tractus solitarius*, einen für das zentrale Stresssystem bedeutenden Gehirnbereich, weiter (Romeo *et al.*, 2001). Die humoralen und die neuralen Mechanismen der afferenten Kommunikation vom Immunsystem zum zentralen Nervensystem werden als sich ergänzende Systeme betrachtet, in denen die schnelle Kommunikation durch den Vagusnerv das ZNS für die Rezeption der langsamer diffundierenden Zytokine sensitivieren kann (Dantzer, 2001).

1.2.2 Efferenter Arm

Bei der Kommunikation des ZNS mit dem Immunsystem dient das endokrine System als funktioneller Vermittler. Beim efferenten Kommunikationsweg wird zwischen einem humoralen und einem neuronalen Weg unterschieden. Der humorale Weg erfolgt über die Freisetzung von neuroendokrinen Mediatoren und der neuronale Weg erfolgt über Nervenfasern. Auf inflammatorische Stimuli und Stress reagiert das ZNS von Säugetieren mit einer neuroendokrinen Aktivierung. Dabei hat die Aktivierung der HPA-Achse und des SNS eine zentrale Bedeutung. Die HPA-Achse ist eine dreigliedrige Hormonachse, bestehend aus dem Hypothalamus (H), der Hypophyse (P, engl. „*Pituitary gland*“) und der Nebenniere (A, engl. „*Adrenal gland*“). Der Hypothalamus bildet das Corticotropin-releasing Hormone (CRH), das in der Hypophyse die Ausschüttung des Adrenocorticotrope Hormons (ACTH) stimuliert. Das ACTH bewirkt in der Nebennierenrinde eine Produktion und Sekretion von Glucocorticoiden. Das zur Gruppe der Glucocorticoide zählende Cortisol reguliert nicht nur den Metabolismus bei Stress, sondern hat auch eine immunsuppressive und entzündungshemmende Wirkung (Pariante *et al.*, 2001; Juruena *et al.*, 2004). In geringen Konzentrationen kann das Cortisol jedoch auch stimulierend auf das Immunsystem wirken. So unterdrücken Glucocorticoide z. B. die Produktion von IL-12 durch APC oder verstärken die Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13 durch Th₂-Zellen. In der Folge kommt es zu einer Verschiebung der T-Helferzell-Balance in Richtung Th₂-Antwort.

Neben den hormonellen Regulationsmechanismen ist das Gehirn auch morphologisch über das SNS mit dem Immunsystem verbunden. Das SNS zählt zusammen mit dem parasympathischen Nervensystem zum autonomen Nervensystem (ANS). Beide Systeme wirken antagonistisch und innervieren eine Vielzahl von Organen und Geweben im Körper (Neuhuber *et al.*, 2004). Aus dem thorakolumbalen Rückenmark entspringen die präganglionären Fasern des Sympathikus. Über die Vorderwurzeln verlassen sie das Rückenmark und ziehen zu den Ganglien des *Truncus sympathicus*. Dort wird ein Teil der präganglionären Fasern auf postganglionäre Neurone umgeschaltet. Ein weiterer Teil der Fasern zieht weiter zu prävertebralen Ganglien vor der *Aorta abdominalis* oder zu den *Ganglia pelvica* und wird dort auf postganglionäre Neurone umgeschaltet. Die Signalübertragung sympathischer Impulse auf die Zielorgane erfolgt meistens über Noradrenalin (NA), seltener über Adrenalin (ADR) (Tsigos *et al.*, 1994; Neuhuber *et al.*, 2004;). Zu den Zielorganen der sympathischen Nervenfasern gehören auch die lymphoiden Organe. Die Innervation der primären und sekundären lymphatischen Organe (siehe Abbildung 1) wurde durch histologische Untersuchungen an Menschen, Hunden, Katzen, Mäusen und Ratten belegt (Felten *et al.*, 1984; Felten *et al.*, 1985; Felten *et al.*, 1988).

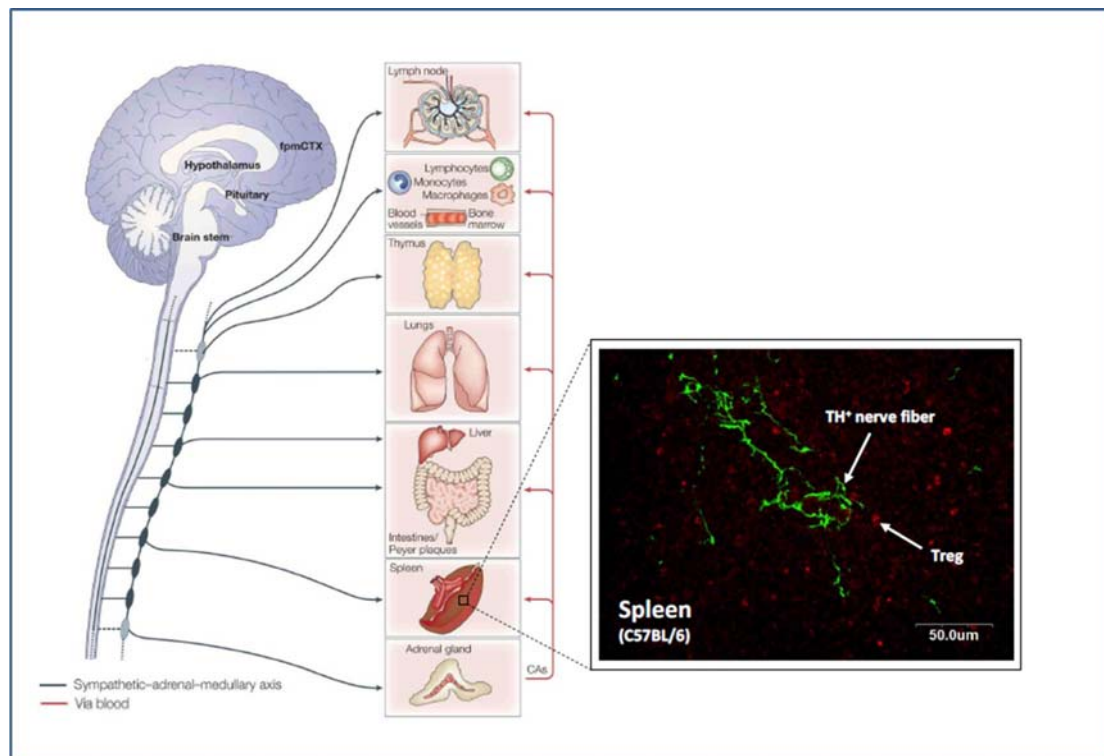


Abbildung 1: Innervation der lymphatischen Organe

Das sympathische Nervensystem (SNS) innerviert mit seinen noradrenergen Nervenfasern primäre (z. B. Thymus und Knochenmark) und sekundäre lymphatische Organe (z. B. Milz, Lymphknoten). Darüber hinaus hat das SNS mit seinen Fasern auch einen direkten Kontakt zu Immunzellen und kann so deren Funktion modulieren. Das Beispiel der Milz zeigt eine Doppelimmunfluoreszenz einer Tyrosinhydroxylase-positiven noradrenergen Nervenfaser (grün) und Lymphozyten, hier am Beispiel von regulatorischen T-Zellen (Foxp3⁺ Zellen, rot). Auf diese Weise werden direkte Kontakte zwischen Nervenfasern und Immunzellen sichtbar. (Modifiziert nach Meisel *et al.*, 2005; Di Comite *et al.*, 2007, Wirth *et al.* in Vorbereitung)

Im Rahmen dieser Studien wurde die Milz von Ratten und Mäusen besonders intensiv erforscht. Histologische Untersuchungen zeigten, dass die Fasern des SNS mit Blutgefäßen assoziiert sind. Tief im Parenchym des Gewebes sind die Fasern mit den glatten vaskulären Muskelzellen assoziiert und regulieren den vaskulären Tonus. Auch der Blutfluss innerhalb der lymphatischen Organe kann so beeinflusst werden.

Innerhalb der Milz wird vor allem die T-Lymphozytenreiche PALS von den Nervenfasern innerviert, während der Bereich mit den B-Zell-Follikeln nur wenig noradrenerg innerviert ist (Williams *et al.*, 1981; Felten *et al.*, 1985; Felten *et al.*, 1987a). Elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten zudem einen direkten Kontakt zwischen sympathischen Nervenendigungen und T-Zellen bzw. Makrophagen ohne unterbrechende Schwannzellen oder Basalmembranen belegen (Raison *et al.*, 2002).

Des Weiteren gliedert sich das SNS in einen humoralen Anteil. Zu diesem Anteil gehören auch die Zellen des Nebennierenmarks, die umgebildeten postganglionären Neuronen entsprechen. Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks produzieren vor allem Adrenalin und weniger Noradrenalin, die ins Blut abgegeben werden und auf den gesamten Körper wir-

ken (Tsigos *et al.*, 2002). Noradrenalin und Adrenalin binden nach ihrer Freisetzung an adrenerge Rezeptoren (AR) in der Membran der Effektor- oder Nervenzellen. Dadurch lösen sie in der Zelle Signalwege aus, die Effekte auf den Muskeltonus oder die Ausschüttung von Sekreten aus den Drüsen zur Folge haben können.

Die Abbildung 2 fasst die möglichen bidirektionalen Kommunikationswege grafisch zusammen.

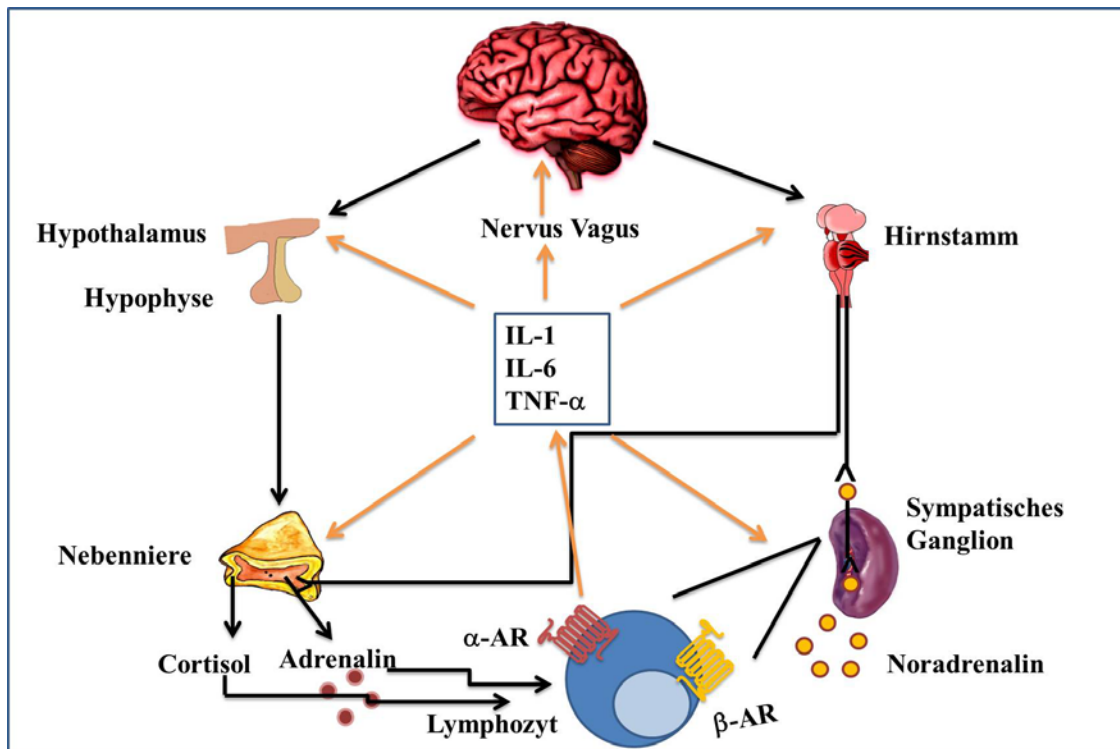


Abbildung 2: Mögliche Wege der bidirektionalen Kommunikation zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Immunsystem

Aktivierte Immunzellen regulieren die Aktivität des ZNS über die Freisetzung von Zytokinen (afferenter Weg = orange Pfeile). Im Gegenzug dazu beeinflusst das ZNS die Funktionen der lymphatischen Organe und Immunzellen in der Peripherie (efferenter Weg = schwarze Pfeile). Dieser efferente Weg kann über die Aktivierung der HPA-Achse oder des sympathischen Nervensystems erfolgen. (Modifiziert nach Elenkov *et al.*, 2000; Kin *et al.*, 2006).

1.2.3 Adrenozeptoren auf Lymphozyten

Das SNS ist in der Lage, das Immunsystem sehr präzise regulierend zu beeinflussen (Felten *et al.*, 1987b; Ackerman *et al.*, 1991b; Raison *et al.*, 2002; Elenkov *et al.*, 2008). Erste Studien identifizierten Katecholamine zunächst als Inhibitoren der Funktion der Immunzellen. Neuere Daten zeigten aber, dass diese Transmitter nicht nur inhibitorische Effekte auf das Immunsystem haben (Kohm *et al.*, 2000; Raison *et al.*, 2002).

Damit Noradrenalin und Adrenalin ihre Wirkung auf Immunzellen ausüben können, binden diese Katecholamine an adrenerge Rezeptoren, die auch auf Immunzellen exprimiert werden (Ader *et al.*, 1990; Bellinger *et al.*, 1996). Diverse Studien an Tieren (Sanders *et al.*, 1997;

Swanson *et al.*, 2001; Engler *et al.*, 2004; Curtin *et al.*, 2009; Riether *et al.*, 2011) und Menschen (Benshop *et al.*, 1996; Schedlowski *et al.*, 1996; Rontgen *et al.*, 2004; Dimitrov *et al.*, 2010) zeigten, dass die Stimulation des adrenergen Rezeptors auf Immunzellen deren Entwicklung (Swanson *et al.*, 2001; Dimitrov *et al.*, 2010), Zirkulation (Schedlowski *et al.*, 1996; Engler *et al.*, 2004) und/oder Funktion beeinträchtigt (Beshop *et al.*, 1996; Schedlowski *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1997; Sanders *et al.*, 2002; Rontgen *et al.*, 2004; Curtin *et al.*, 2009).

Adrenozeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und bestehen aus sieben Transmembrandomänen (Strasser *et al.*, 1992). Die Adrenozeptoren werden anhand ihrer pharmakologischen und molekularbiologischen Eigenschaften in die Klasse der α - und der β -Rezeptoren eingeteilt. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität der adrenergen Agonisten wie Noradrenalin, Adrenalin oder Isoproterenol kann der β -AR in die Subtypen β_1 , β_2 sowie β_3 und der α -AR in die Subtypen α_1 und α_2 eingeteilt werden (Kobilka *et al.*, 1991; Kobilka *et al.*, 1992; Rockman *et al.*, 2002). Studien mit Radioliganden zeigten, dass überwiegend der β_2 -AR auf Lymphozyten exprimiert wird (Schorr *et al.*, 1999; Kohm *et al.*, 2000), wobei diese Expression auf den verschiedenen Lymphozyten variiert. Diese Variation der Expression ist abhängig vom Zelltyp, sowie dem Entwicklungs- und Aktivierungszustand der Zellen. So ist zum Beispiel die Dichte des β_2 -AR auf murinen B-Lymphozyten höher als auf murinen T-Zellen (Fuchs *et al.*, 1988). Studien mit humanen neutrophilen Granulozyten zeigten, dass die Anzahl des β_2 -AR auch von der Lebensphase abhängt. Die neutrophilen Granulozyten von Neugeborenen weisen eine geringere Dichte an β_2 -AR auf als neutrophile Granulozyten von Erwachsenen (Roan *et al.*, 1982). Der Einfluss des Aktivierungszustandes auf die Dichte der Rezeptoren wurde in verschiedenen *in-vitro*-Stimulationen gezeigt. Beispielsweise reduzierte eine intraperitoneale Immunisierung mit roten Blutzellen aus Schafen (engl. „sheep red blood cells“; SRBCs) die Dichte des β_2 -AR auf Lymphozyten (Fuchs *et al.*, 1988), während eine *in-vitro*-Inkubation von Lymphozyten mit Concavalin A (ConA) die Rezeptordichte steigerte (Westly *et al.*, 1994).

Bao *et al.* (2007) bewiesen, dass auch die α_1 - und α_2 -Subtypen auf T-Lymphozyten exprimiert werden. Aber nur eine *in-vitro*-Stimulation des α_2 -Subtyps führte zu einer suppressiven Modulation der T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion.

1.2.4 Katecholamine

Katecholamine wie ADR, NA und Dopamin (DA) wurden erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieben. Sie sind chemische Neurotransmitter des SNS (Kvetnansky *et al.*, 2009). Zur Gruppe der biogenen Amine gehörend besitzen Katecholamine als Grundstruktur

das Brenzkatechin. NA und ADR können auch durch sympathische, cholinerge Stimulation aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn freigesetzt werden und ihre Wirkung als Hormone entfalten (Schauenstein *et al.*, 2006). Das Nebennierenmark sezerniert ca. 80 % Adrenalin und 20 % Noradrenalin in die Blutbahn. Katecholamine nehmen als Regulationsfaktoren eine wichtige Rolle während einer Stresssituation ein, d. h. sie bereiten den Körper auf eine „*fight or flight*“ Reaktion vor (Ranabir *et al.*, 2011). Als Akuthormone der Stressreaktion können Katecholamine bei Bedarf innerhalb von Sekunden massiv ansteigen und ihre Wirkung zur Mobilisierung von Energiereserven sowie zur Steigerung vitaler Prozesse wie Atmung, Herz- und Kreislauffunktion entfalten (Eisenhofer *et al.*, 2004; Schauenstein *et al.*, 2006).

1.2.4.1 Katecholaminsynthese

Die Ausgangssubstanz für die Katecholaminbiosynthese ist die Aminosäure Tyrosin. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt, die Hydroxylierung von Tyrosin zu Levodopa, wird durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert. TH liegt gelöst im Zytoplasma vor und benötigt für seine Funktion die Kofaktoren Tetrahydrobiopterin und Wasser (Molinoff *et al.*, 1971; Kvetnansky *et al.*, 2009).

Im zweiten Schritt entsteht Dopamin infolge der Decarboxylierung von L-DOPA durch die aromatische Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) (Kvetnansky *et al.*, 2009). Das entstandene Dopamin wird von Speichervesikeln im Zytoplasma aufgenommen und durch die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) in Noradrenalin umgewandelt (Feng *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1992). Das Enzym DBH ist abhängig von den Kofaktoren Kupfer, Ascorbinsäure und molekularer Sauerstoff. Im letzten Schritt der Katecholaminbiosynthese entsteht schließlich Adrenalin (Kvetnansky *et al.*, 2009).

Die Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin erfolgt über das Enzym Phenyl-N-Methyltransferase (PNMT), welches ebenfalls im Zytoplasma vorliegt. PNMT ist hauptsächlich im Nebennierenmark, in sympathisch innervierten Organen und im Gehirn lokalisiert. Für seine Funktion benötigt es den Kofaktor S-Adenosyl-Methionin (Molinoff *et al.*, 1971; Kvetnansky *et al.*, 2009). In der nachfolgenden Abbildung 3 ist die Synthese der Katecholamine schematisch dargestellt.

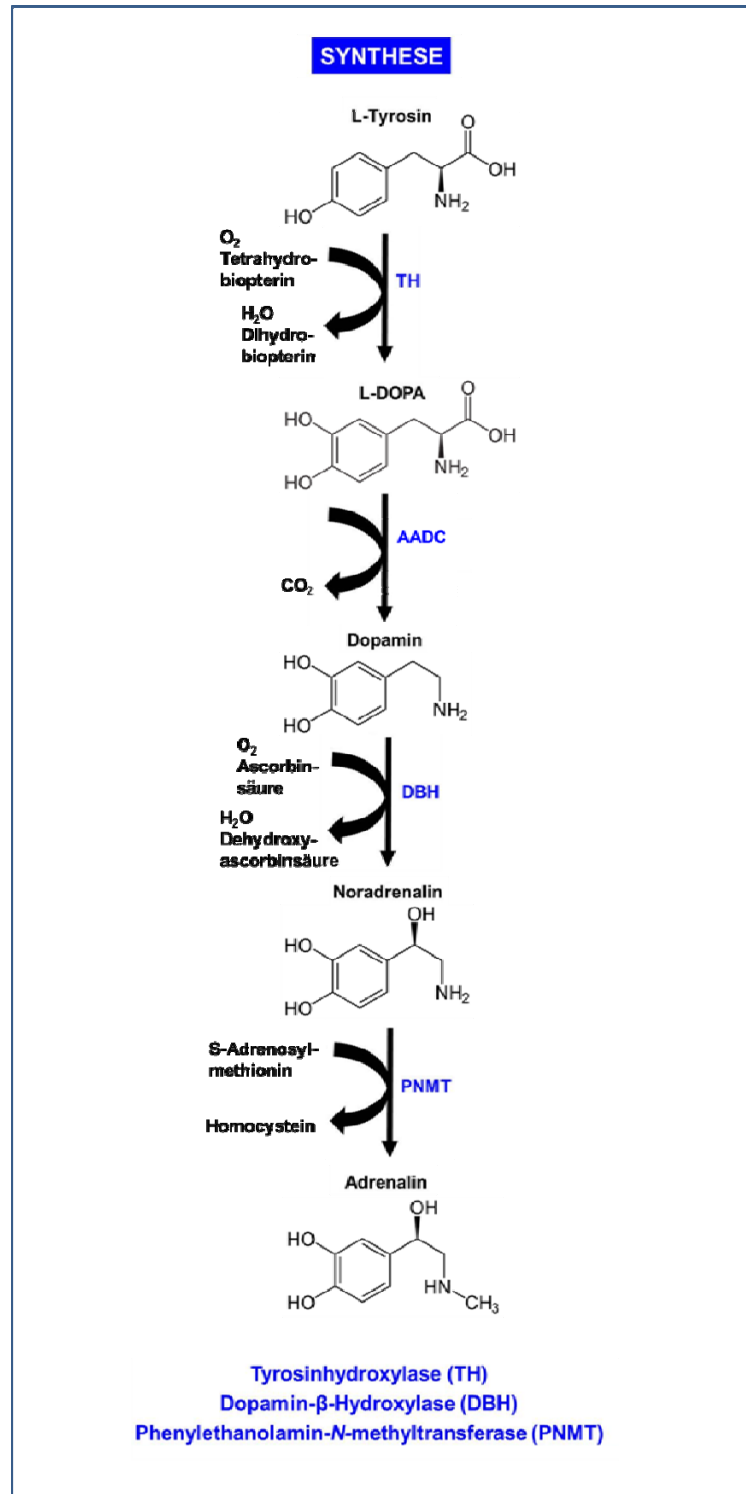


Abbildung 3: Synthese von Katecholaminen

Schematische Darstellung der Katecholaminsynthese. (Modifiziert nach Molinoff *et al.*, 1971; Marino *et al.*, 1999; Kvetnansky *et al.*, 2009)

1.2.4.2 Katecholamindegradierung

Nach der Freisetzung können die biologischen Effekte von Katecholaminen durch eine Wiederaufnahme in den synaptischen Spalt und/oder in die Effektorzellen rasch beendet werden.

Die Aufnahme in den synaptischen Spalt erfolgt über Speichergranula. Diese Form der Speicherung ist energiesparend und die Katecholamine stehen zur Wiederverwendung erneut zur Verfügung (Eisenhofer *et al.*, 1990; Eisenhofer *et al.*, 1991). Die neuronale Wiederaufnahme von Katecholaminen wird durch Noradrenalin- (NAT) bzw. Dopamintransporter (DAT) vermittelt. Der Transport durch NAT und DAT ist ein Na^+ - und temperaturabhängiger Prozess. Die Rate der Wiederaufnahme von NA ist proportional zur Zunahme der NA-Freisetzung (Eisenhofer *et al.*, 1990; Eisenhofer *et al.*, 1991). Neben der Wiederaufnahme von Katecholaminen in die sympathischen Nervenendigungen kann die Freisetzung von Katecholaminen auch durch eine Degradierung der Neurotransmitter zu inaktiven Metaboliten beendet werden. Für die Degradierung von Katecholaminen sind zwei Enzyme essenziell: die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO) (Molinoff *et al.*, 1971).

MAO ist ein in der Außenmembran von Mitochondrien liegendes Enzym und inaktiviert neuronale Katecholamine. Es desaminiert Katecholamine in Anwesenheit von Wasser und molekularem Sauerstoff zu Aldehyden, Ammoniak und Wasserstoffperoxid. Das Enzym kommt in zwei Isoformen vor, MAO-A und MAO-B, die sich zum einen durch ihr Vorkommen unterscheiden. Während MAO-A in der Peripherie vorkommt, befindet sich MAO-B im ZNS. Zum anderen unterscheiden sie sich in ihrer Affinität zu den Katecholaminen. MAO-A besitzt eine höhere Affinität zu NA und ADR, wohingegen MAO-B hauptsächlich bei der Degradierung von DA eine Rolle spielt (Shih, 2004). Der Großteil des NAs wird durch MAO-A zu Dihydroxyphenylglycol (DHPG) abgebaut (Shannon *et al.*, 2000). Zirkulierende Katecholamine werden hingegen durch COMT degradiert. Dieses primär extraneuronale Enzym ist in den Effektorzellen lokalisiert (Eisenhofer *et al.*, 1998). Es benötigt für seine Aktivität S-Adenosylmethionin als Kofaktor. Abbildung 4 fasst die Degradierung von Katecholaminen zusammen.

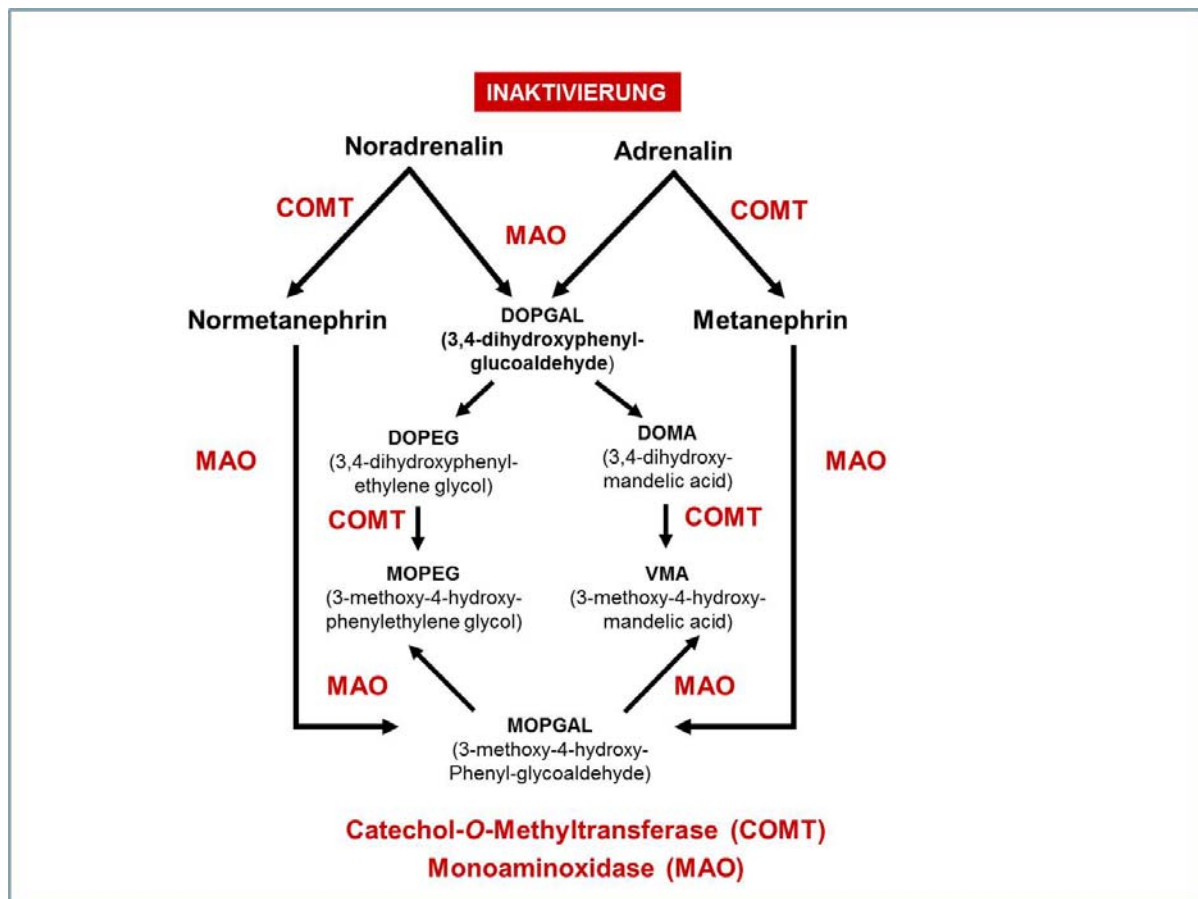


Abbildung 4: Degradierung von Katecholaminen

Für die Degradierung von Katecholaminen sind zwei Enzyme essenziell: die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO). Infolge der Degradierung werden die Katecholamine zu physiologisch inaktiven Metaboliten abgebaut (Modifiziert nach Molinoff et al., 1971; Marino et al., 1999; Kvetnansky et al., 2009).

1.2.5 Adrenerge Einflüsse auf die Funktion von Immunzellen

Katecholamine können über bestimmte Adrenozeptor-Subtypen die angeborenen und die adaptiven Immunfunktionen beeinflussen (Madden *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass eine LPS-induzierte Proliferation von B-Lymphozyten durch eine gleichzeitige Behandlung mit NA verstärkt wird. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Propranolol – einem β -AR Antagonisten – gehemmt (Koussi *et al.*, 1988). Ein gegenteiliger Effekt konnte bei T-Lymphozyten beobachtet werden. Bei T-Zellen führte eine Stimulation des β -ARs durch Isoproterenol oder Terbutalin zu einer Hemmung der Proliferation (Bartik *et al.*, 1993; Riether *et al.*, 2011).

In-vivo-Studien am Menschen zeigten, dass eine Injektion von NA zu einem Anstieg an zirkulierenden $CD8^+$ -Lymphozyten und NK-Zellen führte, während die Zahl zirkulierender $CD4^+$ -Zellen sank (Landmann *et al.*, 1981; van Tits *et al.*, 1990). Die NA-Konzentration entscheidet, ob es zu einem aktivierenden oder hemmenden Effekt kommt (Hellstrand *et al.*, 1985). Josefsson *et al.* (1996) und Bergquist *et al.* (1997) wiesen nach, dass eine geringe Konzentra-

tion von 10 μM NA die Proliferation und die Differenzierung von Immunzellen förderte, während eine hohe Dosis (100 μM bzw. 500 μM) eine Apoptose bei humanen Immunzellen einleitete. Weitere Studien *in vitro* und *in vivo* belegten ebenfalls, dass Katecholamine eine Apoptose von Lymphozyten sowohl in der Peripherie als auch im Thymus bewirkten (Cosen-tino *et al.*, 2002a; Mignini *et al.*, 2003, Jiang *et al.*, 2009). Ebenso hemmen zu hohe NA-Konzentrationen über den β -AR die Freisetzung von IL-1 (Koff *et al.*, 1986) und IL-12 (Baltrusch *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1995) sowie die Sekretion von TNF (Chou *et al.*, 1996; Hasko, 2001). Dieser Mechanismus könnte verantwortlich für die Regulation von Immunzell-funktionen wie Proliferation, Differenzierung und Wachstum sein (Jiang *et al.*, 2009).

Auch die Lyse von spezifischen Zielzellen kann durch Katecholamine inhibiert werden (Katz *et al.*, 1982; Hatfield *et al.*, 1986; Takayama *et al.*, 1988). Studien, die sich mit der angeborenen Immunität beschäftigten, zeigten, dass eine durch LPS induzierte TNF-Produktion in Monozyten durch eine gleichzeitige Behandlung mit ADR oder Isoproterenol reduziert wurde (Severn *et al.*, 1992).

Auch *in-vivo*-Experimente belegten die Wirkung des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem. Eine Zerstörung der sympathischen Innervation der lymphatischen Organe durch das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) führte zu einer Verstärkung oder einer Suppression der Immunantwort (Madden *et al.*, 1989; Ackermann *et al.*, 1991a; Madden *et al.*, 1994a; Madden *et al.*, 1994b; Kruszezwska *et al.*, 1995; Leo *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 2000). Die Ausschaltung des Sympathikus durch eine chemische Schädigung wird als chemische Sympathektomie bezeichnet. Die chemische Sympathektomie beeinflusst verschiedene Immunfunktionen wie z. B. Änderung der Antikörperproduktion (Livnat *et al.*, 1985; Kohm *et al.*, 1999), Aktivität von NK-Zellen (Reder *et al.*, 1989), T-Zellproliferation (Moynihan *et al.*, 2004), die Anfälligkeit für Infektionen (Leo *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2001) oder den Schweregrad von Autoimmunerkrankungen (Chelmicka-Schorr *et al.*, 1988).

Eine weitere Möglichkeit, *in vivo* den Zusammenhang zwischen Immunsystem und ZNS zu untersuchen, besteht darin, Katecholamine zu infundieren. Eine *in vivo* Verabreichung von Katecholaminen und gleichzeitiger Antigengabe induzierte eine frühere IgM und IgG Plaque-Bildung im Vergleich zu Kontrolltieren, die keine Katecholamininfusion erhalten haben (Depelchin *et al.*, 1981).

1.2.6 Adrenerge Einflüsse auf die Immunantwort

Eine Interaktion zwischen Nervensystem und Immunsystem während einer Infektion oder Erkrankung wurde ebenfalls erforscht. So zeigten Templeton *et al.* (2008), dass eine Herpes-

Simplex-Virus-1- (HSV-1) Infektion in sympathektomierten Mäusen zu einer erhöhten Viruslast und in der Folge zu erhöhter Mortalität der Tiere führte. Weitere Studien mit einer HSV-1 Infektion belegten, dass eine verminderte lytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen mit der Zerstörung der noradrenergen Nervenfasern korrelierte (Leo *et al.*, 2000). Aber auch gegenteilige Effekte wurden beobachtet. *In-vivo*-Experimente mit Rhesusmakaken zeigten, dass die Replikationsrate des Simianen Immundefizienzvirus (SIV) in Lymphknoten mit vielen katecholaminergen Nervenfasern signifikant höher war als in Lymphknoten mit einer geringen katecholaminergen Innervation (Sloan *et al.*, 2006). Auch die Replikation des Humanen Immundefizienzvirus (HIV) wurde durch Freisetzung von NA verstärkt, was einen Anstieg der Viruslast zur Folge hatte (Cole *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1999; Cole *et al.*, 2001).

Arbeiten mit dem Influenza-A-Virus zeigten, dass eine periphere noradrenerge Depletion, hervorgerufen durch 6-OHDA, zu keiner veränderten Viruslast in der Lunge führte. Allerdings verbesserte sich die Überlebensrate von Mäusen, die mit dem Influenza-A-Virus infiziert waren (Grebe *et al.*, 2010).

Die noradrenerge Innervation hat nicht nur auf den Verlauf einer viralen Infektion Einfluss, sondern auch auf den einer bakteriellen Infektionen. Eine Erhöhung der Immunantwort und somit eine Reduktion der Bakterienlast wurde auch während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* in sympathektomierten Tieren beobachtet (Rice *et al.*, 2002).

1.3 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Obwohl Zellen des Immunsystems als neue Quellen für neuroendokrine Mediatoren wie Katecholamine diskutiert werden, gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen zur Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels in Immunzellen. Im Detail sollte in dieser Arbeit folgenden Frage nachgegangen werden: Expressieren murine Leukozyten der Milz die Enzyme des Katecholaminstoffwechsels? Gibt es Unterschiede in der Expressionsstärke in verschiedenen Leukozytensubpopulationen? Zusätzlich sollte der erstmalige Vergleich der Expression mit klassischen Orten des Katecholaminstoffwechsels bei der physiologischen Einordnung der Befunde helfen.

Da bereits in früheren Studien insbesondere nach einer Zellaktivierung eine ausgeprägte Veränderung der Expression beobachtet wurde, sollte untersucht werden, wie eine T- bzw. B-Zellaktivierung die Enzymexpression *in vitro* verändert.

Basierend auf den *in-vitro*-Befunden sollten dann mithilfe eines murinen Retroviralen Infektionsmodells, das Friend Virus (FV (Friend, 1957)), weitere Untersuchungen *in vivo* durchge-

führt werden. Folgende Frage stand dabei im Vordergrund: Welchen Einfluss hat eine FV-Infektion auf die Enzymexpression und die NoradrenalinKonzentration in der Milz?

Die Bedeutung des SNS auf den Verlauf einer Virusinfektion sollte in Experimenten, bei denen methodisch eine chemische Sympathektomie verwendet wurde, analysiert werden. Dabei sollte im Detail auf folgende Fragen eingegangen werden. Wie wirkt sich das Fehlen der sympathischen Innervation auf die Enzymexpression in den Milzleukozyten aus? Welchen Einfluss hat eine chemische Sympathektomie auf das Milzgewicht und die Viruslast in FV-infizierten Mäusen? Welche Auswirkung hat eine chemische Sympathektomie auf die Immunantwort gegen den FV? Dies sollte anhand von Analysen zu Zytokinproduzierenden T-Zellen, der Effektorfunktion von CTLs und der Expansion von T_{regs} untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Für die *in-vitro*-Experimente wurden männliche Tiere des Inzucht-Mausstammes C57BL/6 verwendet, die im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gezüchtet und gehalten wurden. Für die *in-vivo*-Experimente mit Friend Retrovirus wurden männliche Mäuse des Stammes C57BL/6 mit den Resistenzgenen H-2D^{b/b}, Fv-2^{r/s} des Züchters Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) verwendet. Bei Versuchsbeginn waren die Tiere mindestens 8 und maximal 12 Wochen alt. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $20 \pm 1^\circ \text{C}$, relative Luftfeuchte $50 \pm 5 \%$, Hell-Dunkel-Zyklus von 12 : 12 Stunden) in Polycarbonatkäfigen mit unbehandelten Hobelspänen als Einstreu gehalten. Standardisiertes Nagerfutter (Pellets der Firma Ssniff) und Leitungswasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Viren und Zelllinie

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete FV-Stock sowie die *Mus dunni* Fibroblasten-Zelllinie wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulf Dittmer (Institut für Experimentelle Virologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt.

2.3 Chemikalien

Alle üblichen Laborchemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

In der unten stehenden Liste sind die speziell für diese Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

CellFix (Becton-Dickinson, Heidelberg), Cellclean (Sysmex, Bremerhaven), Cellpack (Sysmex, Bremerhaven), Cyclosporin A ((CsA) Apotheke des Universitätsklinikums Essen), FACS Clean (Becton-Dickinson, Heidelberg), FACS Lysing Solution (Becton-Dickinson, Heidelberg), FACS Shutdown (Becton-Dickinson, Heidelberg), 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), PharmLyse (Becton-Dickinson, Heidelberg),

2.4 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit *Aqua dest.* angesetzt und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 1: Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Substanzen	Hersteller
3-Amino 4-Ethylencarbazol (AEC)-Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung wurde 1 : 20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 µl 30 %iger H ₂ O ₂ pro mL Lösung gestartet
AEC-Stocklösung (4 mg/mL)	20 AEC-Tabletten in 100 mL N-N Dimethylformamid lösen
FACS-Puffer	500 mL PBS, pH 7,4 10 mL FCS 500 mg Natriumazid
FAST qPCR Master Mix Plus Low ROX	Eurogentec, Köln
FAST qPCR Master Mix Plus Low ROX w/o UNG	Eurogentec, Köln
Medium für <i>Mus dunni</i> Zellen	RPMI 1640 10 % FCS 0,5 % Penicillin/Streptomycin
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,05 M EDTA (0,5 M) pH auf 8,0 einstellen

2.5 Biochemikalien, Antikörper, Oligonukleotide und Sonden

In der nachfolgenden Tabelle 2 befinden sich alle verwendeten Standardkits.

Tabelle 2: Verwendete Standardkits

Reagenzien	Hersteller
GoTaq® PCR Core Systems	Promega, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, 200 Reactions	Applied Biosystems, Darmstadt
Human Adrenal Gland Total RNA	Clontech, Saint-Germain-en-Laye Frankreich
Maus Brainstem Total RNA	Clontech, Saint-Germain-en-Laye Frankreich
RNeasy Micro Kit® 50	Qiagen, Hilden

Alle in der Tabelle 3 aufgelisteten Antikörper wurden von BD Pharmingen (Heidelberg), Biolegend (Eiching), Dako (Hamburg) oder Sigma Aldrich (Steinheim) bezogen.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Klon	Markierung	Organismus
Maus Anti- Human CD3 ¹	UCHT1	FITC	Human
Maus Anti-Human CD4 ¹	RPA-T4	APC	Human
NA/LE Maus Anti-Human CD3 ²	HIT3a		Human
NA/LE Maus Anti-Human CD28 ²	CD 28.2		Human
Hamster Anti-Maus CD3ε ¹	145-2C11	PerCP	Maus
Ratte Anti-Maus CD4 ¹	RM4-5	PE	Maus
Ratte Anti-Maus F4-/80 ¹	BM8	FITC	Maus
Ratte Anti-Maus CD19 ¹	6D5	FITC	Maus
Ratte Anti-Maus CD11b ¹	M1/70	APC	Maus
Ratte Anti-Maus CD45 ¹	30-F11	Pacific-Blue	Maus
Ratte Anti-Maus CD25 ¹	PC61	APC	Maus
Ratte Anti-Maus CD43 ¹	1B11	PerCP	Maus
Ratte Anti-Maus CD4 ¹	RM4-5	AF700	Maus
Ratte Anti-Maus CD62L ¹	MEL-14	PeCy7	Maus
Maus Anti-Human GzmB ¹	GB12	APC	Maus
Ratte Anti-Maus INFγ ¹	XmG1.2	FITC	Maus
Ratte Anti-Maus Foxp3 ¹	FJK-16S	FITC	Maus
Ratte Anti-Maus IL-2 ¹	JES6-5H4	PE	Maus
Ratte Anti-Maus TNF-α ¹	MP6-XT22	PeCy7	Maus
Purified Anti-Maus CD3ε ²	500A2		Maus
LEAF™ Purified Anti-Maus CD 28 ²	37-51		Maus
Hamster Anti-Maus CD40 ²	HM40-3		Maus
Ziege Anti-Maus IgM F(ab') ₂ μ-Chain ²			Maus
AK 720; Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)			Maus
Ziege Anti-Maus IgG2b-HRP			Maus

Abkürzungen: FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE = R-Phycoerythrin; PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex; PeCy7 = Phycoerythrin-Cy7; APC = Allophycocyanin; AF700 = Alexa Fluor 700; ¹ Antikörper für die extrazelluläre Färbung von Oberflächenmarkern zur Identifizierung von Zellpopulationen; ² Antikörper T- bzw. B-Zellstimulation.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und Sonden (vgl. Tabelle 4) wurden mithilfe der *Primer Express Software 3.0* der Firma Applied Biosystems designt und bei der Firma Eurogentec synthetisiert.

2. Material

Tabelle 4: Verwendeten Oligonukleotide und Sonden

Gen	Accession-Nr.		Maus Sequenz 5'-3'	bp	Accession-Nr.	Mensch Sequenz 5'-3'	bp
β-Aktin	NC_000071.6	FP	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	20			
		RP	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	21			
		S	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC	23			
DBH	NM_138942.3	FP	TCTCCGACTGGAAGTTCATTACC	23			
		RP	TAGCGTCGGAGAGTAGCTGTGTA	23			
		S	CCCACGGAAGATACAAGGCCGGC	23			
COMT	NM_007744.3	FP	CCCAGCAAATGCTGGACTTC	20	M58525.1	CGCTTCTCTTGGAGGAATGTG	21
		RP	GGATAAGGTCCTGGGATGCC	20		CGATTGGTAGTGTGTGCACTCA	22
		S	GCCTACAGGACAAAGTTTCCATCCTCATCG	30		TGATCTGCCCAGGTGCGCCA	20
GAPDH	NM_008084	FP	TCACCACCATGGAGAAGGC	19			
		RP	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	20			
		S	ATGCCCCCATGTTTGTGATGGGTGT	25			
MAO-A	NM_173740.2	FP	CCCATTCCTGGTGCATT	18	NM_000240.2	GCGGTTTGCTTATCTTTTGTGA	23
		RP	CAGGGATCTCTTTCCCATATCA	22		CCGTTCTGGCCACCAT	17
		S	CACCTGTGTGGAACCCCTTGGA	23		TCAATGTGACCTCTGAGCCTCACGAAGTG	29
TH	NM_009377.1	FP	CCGTCTCAGAGCAGGATACCA	21			
		RP	ACTCTGCCGCCGTCCAA	17			
		S	CCGAGGCTGTCACGTCCCCAAG	22			
PNMT	NM_008890.1	FP	GAGCCTTTGACTGGAGTGTGTATAGT	26			
		RP	CGAAGCTGGCGTTCTTTCTC	20			
		S	TTGAGGACAAGGGTGAGTCCTGGCA	25			

Abkürzungen: FP = Forward Primer; RP = Reverse Primer; S = Sonde, die Sonde war am Reporter mit dem Farbstoff 6-FAM und am 3'-Ende mit BHQ-1 markiert.

2.6 Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Die Verbrauchsmaterialien (Zellkulturplatten, Pipetten, PP-Schraubenverschlussröhrchen, Pipettenspitzen, Kanülen, Einmalspritzen, Zellsiebe und Reaktionsgefäße) wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt), Becton, Dickinson and Company BD (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Falcon BD (Heidelberg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Nalgene (Labware Dänemark), TPP (Schweiz) und Ratiolab (Dreieich) bezogen.

Für die Arbeiten im Labor wurden die unter Tabelle 5 aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte

Geräte	Hersteller
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystem, Darmstadt
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Darmstadt
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH, Offenburg
FACS Canto II	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg
KX-21 N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Megafuge 1.0R	Heraeus, Thermo Scientific, Hanau
Quadro MACS – Magnetständer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Roller RM5	Assistent, London
Rotanta 460 RS	Hettich, Tuttlingen
Rotor Stator	Dremel, Leinfelden-Echterdingen
Scil Vet ABS (Animal Blood Counter)	Scil animal care company, Viernheim
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Universal 320 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Tötung der Versuchstiere und Entnahme von Organen

Die Versuchstiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet, Mäuse in Rückenlage fixiert und das Fell mit 70 %igen Ethanol desinfiziert.

Zur Entnahme der Milz wurden Bauchdecke und Peritoneum eröffnet und das Organ zunächst in einer sterilen Gewebekulturschale aufgenommen. Mithilfe von sterilen Pinzetten wurden Bindegewebe und Fett sorgfältig entfernt. Zur Bestimmung des Milzgewichtes wurde das Organ in eine sterile vortarierte Gewebekulturschale überführt und anschließend auf einer Analysenwaage gewogen. Danach wurde die Milz in ein steriles mit *Hanks` balanced salt solution* (HBSS) gefülltes 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert. Nebennieren und Hirnstamm wurden nach der Entnahme von Fett und Bindegewebe befreit, in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 500 µL RLT-Puffer (aus RNeasy Micro Kit, Qiagen) aufgenommen und bis zur RNA-Isolation (siehe Abschnitt 2.8.1) auf Eis aufbewahrt.

2.7.2 Isolierung von murinen Leukozyten der Milz

Die Aufarbeitung der Leukozyten der Milz erfolgte in der Sterilbank. Die Milz wurde in eine Petrischale mit 10 mL eiskaltem HBSS gegeben und mit dem Kolbenende einer 20 mL Einwegspritze wurde die Pulpa aus dem Bindegewebe herausgequetscht. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) überführt, mit eiskaltem HBSS auf 30 mL aufgefüllt und zentrifugiert (400 x g, 8 min., 4° C). Die Lyse der Erythrozyten erfolgte mittels dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Pharm-Lyse (1 mL pro Milz); anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt und abermals zentrifugiert. Größere Bestandteile wie Bindegewebe und Fettgewebe wurden mithilfe eines 70 µm Nylon-siebs entfernt. Die Anzahl an Leukozyten pro Milliliter Zellsuspension wurde mithilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes (Scil Vet ABC; Scil animal care company, Viernheim) bestimmt.

2.7.3 Isolierung von peripheren humanen PBMCs aus dem Vollblut

Vollblut wurde aus der *Vena brachialis* von gesunden Probanden entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch das medizinische Fachpersonal des Institutes. Aus dem heparinisierten Vollblut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen gewonnen.

Dazu wurde das Blut 1 : 2 mit 1 x PBS verdünnt und anschließend auf 15 mL Ficoll vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen (50 mL) überschichtet und zentrifugiert (450 x g ohne Bremse, 30 min., Raumtemperatur). Die mononukleäre Zellfraktion in der Interphase wurde vorsichtig abpipettiert. Es folgten zwei Waschschrte mit HBSS (450 x g, 10 min, Raumtemperatur). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 20 mL Medium resuspendiert und die Zellkonzentration mithilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes (KX-21 N; Sysmex Deutschland GmbH, Nordstedt) eingestellt.

2.7.4 Prinzip der immunomagnetischen Selektion

Zur Isolierung verschiedener Zellpopulationen wurde das magnetische Zellsortierungssystem (engl. „*Magnetic Cell Sorting*“, MACS) angewendet. Dabei wurde das „*Humane Pan T cell Isolation Kit*“ und für die Gewebe ansässigen Immunzellen die „*Micro Beads CD4, CD8, CD11b, CD19 und CD90.2*“ verwendet.

Das Prinzip der immunomagnetischen Selektion beruht auf der Sortierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle mithilfe von Antikörpern, die an magnetische Kügelchen (sogenannte „*Micro Beads*“) gekoppelt sind. Durch eine Inkubation der Zellsuspension mit monoklonalen Antikörpern werden die gewünschten Zellpopulationen indirekt mit den magnetischen *Micro Beads* markiert. Die Selektion erfolgt über eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet. Markierte Zellen werden durch das Magnetfeld auf der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säule passieren können. Indem die Säule aus dem Magnetfeld genommen und mit Medium gespült wird, können die markierten Zellen von der Säule eluiert werden, markierte und unmarkierte Zellpopulationen voneinander getrennt werden. Es gibt zwei verschiedene Selektionsprinzipien. Die gesuchte Zellfraktion kann direkt mit dem Antikörper markiert werden (= positive Selektion), während bei der negativen Selektion die nicht gesuchte Zellfraktion depletiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die positive Selektion (Maus) als auch die Depletion (Human) verwendet. Alle Selektionen wurden nach dem Herstellerskript durchgeführt. Die Qualität der Aufreinigung wurde anschließend mit einer durchflusszytometrischen Analyse überprüft. Die Anzahl an eluierten Zellen wurden mittels elektronischen Partikelzählgerätes bestimmt und auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/mL eingestellt

2.7.5 Stimulation des T-Zell Rezeptors

Weil lösliche anti-CD3 Antikörper den TCR auf isolierten T-Zellen nicht aktivieren können (Meuer *et al.*, 1983; van Lier *et al.*, 1989; Appel *et al.*, 2000), wurden alle verwendeten anti-CD3-Klone an Zellkulturplatten gebunden (= immobilisiert). Hierzu wurde der anti-CD3-Antikörper mit sterilem PBS auf 0,5 µg/mL eingestellt und 200 µL der anti-CD3-Antikörperlösung wurde auf die Zellkulturplatten vorgelegt. Die abgedeckten Zellkulturplatten wurden für mindestens 2 h bei 37° C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Platte dreimal mit 1 mL sterilem PBS gewaschen und auf einem Tuch trocken geschlagen. Für den Stimulationsversuch wurden die isolierten T-Zellen auf die vorbehandelte Kulturplatte überführt. Als kostimulatorisches Signal für den TCR wurde löslicher anti-CD28-mAK verwendet. Nach Inkubationszeiten von jeweils 3, 6, 12, 24, 36 und 48 h wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert.

2.7.6 Nachweis infektiöser Zellen mit dem *Infectious Center Assays*

Die Quantifizierung infektiöser Zellen erfolgte mithilfe von virusspezifischen Antikörpern. Hierzu wurden die Milzen von FV-infizierten Mäusen entnommen und eine Zellsuspension hergestellt. Eine Koinkubation mit der Indikatorzelllinie *Mus dunni* führt zu einer Infektion dieser Zelllinie über den Zell-Zell-Kontakt. Der Retrovirus baut sich in das Wirtsgenom ein und wird bei der Mitose an die Tochterzelle weitergegeben. Somit entsteht ein Virusfokus, der über eine Antikörperreaktion visualisiert werden kann. Dieser immunologische Nachweis verwendet einen Primär- und einen Sekundärantikörper. Dabei bindet der Primärantikörper, hier AK720, an das Hüllprotein (engl. „*envelop*“; *env*) des F-MuLV. Der sekundäre Antikörper, der mit einer Meerettichperoxidase gekoppelt ist, bindet kovalent an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das zugegebene Chromogen 3-Amino-4-Ethylencarbazol (AEC) wird durch die Peroxidase in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die roten Punkte markieren die Virusfoci auf dem Zellrasen. Anhand einer Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl wird die Anzahl an infektiösen Milzzellen ermittelt.

In eine 6-Well Zellkulturplatte wurden 2×10^4 *Mus dunni* Zellen in 3 mL Medium ausgesät und am darauffolgenden Versuchstag die Zellsuspension der FV-infizierten Mäuse auf eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Diese Zellsuspension wurde in einer Verdünnungsreihe von 1×10^7 bis 1×10^2 auf die *Mus dunni* Zellen gegeben und 3 Tage unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37° C) inkubiert. Nach dem Ende der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen in 95 %igen Ethanol fixiert und anschließend mit PBS/0,1 %BSA gewaschen. Daraufhin wurde jede Probe mit 700 µL Hybridomaüberstand des Primärantikörpers

(monoklonaler Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)) für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und der Zellrasen zweimal mit PBS/0,1 % BSA gewaschen. Der Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG2b-HRP) wurde 1 : 500 in PBS/0,1 % BSA verdünnt. Jede Probe wurde mit 700 µL Antikörper für 90 min. bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellrasen zweimal mit PBS/0,1 % BSA gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 2 mL frisch angesetztes AEC hinzugegeben und unter Lichtausschluss für 20 min. inkubiert. Die Substratlösung wurde nach der Inkubationszeit entfernt, der Zellrasen mit *Aqua bidest* gewaschen und die Platte getrocknet. Die Foci wurden am nächsten Tag gezählt.

Die Anzahl infizierter Zellen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Anzahl der infizierten Zellen} = \frac{\text{Anzahl der Foci}}{\text{Anzahl der Leukozyten pro Milz}}$$

2.7.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die isolierten murinen und humanen Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmoleküle beziehungsweise intrazellulären Zytokine zu analysieren und näher zu charakterisieren. Mithilfe der Durchflusszytometrie (engl. „*fluorescence activated cell sorting*“, FACS) lassen sich individuelle Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation anhand ihrer Größe, Granularität, intrazellulären Proteine oder Oberflächenproteine identifizieren, charakterisieren und quantifizieren.

Für jede in dieser Arbeit durchgeführte FACS-Färbung wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Bei der Auswertung wird ein Punktgraph (engl. „*Dot-Plot*“) gewählt, in welchem jede Zelle als ein Punkt dargestellt wird und die gesuchte Zellfraktion anhand der Größe, Granularität und Fluoreszenzemission der gebundenen Antikörper identifiziert werden kann.

2.7.7.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Die Effizienz der immunomagnetischen Selektion wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Zunächst wurden 50 µL kalter FACS-Puffer vorgelegt, anschließend die Antikörper

(Tabelle 3) sowie 50 µL der isolierten Zellen hinzugegeben, gut vermischt und im Dunkeln bei 4°C für 30 min. inkubiert. Anschließend folgte die Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurde der Reaktionsansatz in 1 mL FACS-Lyselösung (1 : 10 mit *Aqua dest.*) resuspendiert, wieder gut vermischt und bei RT unter Lichtausschluss für 10 min. inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min., 450 x g, 4° C), mit 2 mL kaltem FACS-Puffer gewaschen und abermals zentrifugiert (5 min., 450 x g, 4° C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Sediment zur Analyse in 300 µL kaltem FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer gemessen.

2.7.7.2 Färbung intrazellulärer Proteine

Der intrazelluläre Gehalt an Granzym B, Foxp3, IFN- γ , TNF- α und IL-2 wurde mithilfe des Kits „Cytofix/Cytoperm“ und des „Foxp3-Staining Set“ quantifiziert. Ein essenzieller Schritt während der intrazellulären Färbung von Proteinen für die Durchflusszytometrie ist die Fixierung sowie die Permeabilisierung der Zelle. Durch die Permeabilisierung können Antikörper, die gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle eindringen und diese binden. Dies ist notwendig, um die intrazellulären Proteine über einen an Fluorchrom konjugierten Antikörper zu markieren und eine anschließende FACS-Analyse durchführen zu können.

2.7.7.2.1 Granzym B und Foxp3 Färbung

Im Anschluss an die Oberflächenfärbung (siehe Abschnitt 2.7.7.1) wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (300 x g, 5 min., RT). Die Fixierung sowie die Permeabilisierung der Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Im Anschluss an das einmalige Waschen der Zellen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit 100 µL PermWash-Puffer und 0,5 µL GzmB bzw. FoxP3 Antikörper für 30 min. bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie in einem Volumen vom 300 µL FACS-Puffer aufgenommen, gut gemischt und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

2.7.7.2.2 IFN- γ , TNF- α und IL-2 Färbung

T-Zellen beginnen unmittelbar nach TCR-Stimulation, Zytokine wie IL-2, IFN- γ oder TNF- α zu sezernieren. Um die Expression dieser Zytokine mittels Durchflusszytometrie genauer untersuchen zu können, muss diese Sekretion verhindert werden. Dazu wurde der intrazelluläre Proteintransport mittels Brefeldin A (BFA) blockiert. BFA inhibiert den vesikulären anterograden Proteintransport (vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat) und

führt so zu einer Akkumulation der Zytokine in der Zelle. Die Zytokinproduktion wurde mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die T-Zellen, deren intrazelluläre Zytokinproduktion nachgewiesen werden sollte, wurden für 4 h mit 10 µg/mL immobilisierten anti-CD3-Antikörpern, 2 µg/mL anti-CD28-Antikörpern und 2 µg/mL BFA in RPMI-Medium bei 37° C inkubiert. Durch die Antikörperstimulation wird die T-Zelle angeregt, Zytokine zu synthetisieren. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und zunächst die Oberflächenmarker gefärbt (wie unter 2.7.7.1 beschrieben). Das enthaltene Paraformaldehyd diente hierbei der Fixierung der Zellen und das Saponin der Permeabilisierung der Zellmembranen. Zur intrazellulären Färbung wurden die Zellen für 15 min. im Dunkeln mit den entsprechenden Antikörpern für TNF- α , IL-2 oder IFN- γ inkubiert. Die Zellen wurden mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 300 µL FACS-Puffer aufgenommen und mithilfe des Durchflusszytometers analysiert.

2.7.7.2.3. Tetramerfärbung

T-Zellen besitzen die Fähigkeit, Antigene, die an MHC-Moleküle gebunden sind, zu erkennen. Um diese spezifischen Zellen detektieren zu können, werden die Zellen mithilfe von an Fluorochrom gekoppelten Tetrameren analysiert. Ein Tetramer besteht aus vier MHC-Peptid-Komplexen, die über einen Biotin-Streptavidin-Komplex kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über ein konjugiertes Fluorochrom im Durchflusszytometer visualisiert.

Für diese Färbung wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt. Für die MHC-I-Färbung wurden die Zellen in einem Volumen von 50 µL für 30 min bei RT gefärbt. Für die Färbung wurden 0,5 µL Tetramer mit den Antikörpern CD8 (0,5 µL), CD43 (0,5 µL) und CD62L (0,5 µL) pro Probe eingesetzt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 300 µL FACS-Puffer mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen) verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte auf zwei Arten; einmal auf mechanische Art, mit einem Rotor Stator, sowie chemisch durch β -Mercaptoethanol, das zum RLT-Puffer zugefügt wurde. Anschließend wurde die Isolierung der Gesamt-RNA nach Herstellerangaben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben noch mit dem RNase-freien DNase Set behandelt. Zur Quantifizierung der Nukleotide wurde die Absorption der Proben mit dem Photometer bestimmt.

2.8.2 Reverse Transkription

Um die isolierte RNA in der quantitativen PCR (qPCR) einsetzen zu können, muss sie zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Prozess heißt Reverse Transkription (RT-PCR). Die Reverse Transkription erfolgte mit dem „*High-Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit*“ von Applied Biosystems und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die gewonnene cDNA kann entweder direkt in der qPCR eingesetzt oder bei -20° C gelagert werden.

2.8.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Bei der quantitativen PCR, auch Real-Time PCR genannt, kann neben der Amplifikation von Nukleinsäuren diese zusätzlich quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt mithilfe von Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (= Sonde), deren Fluoreszenzen während eine PCR-Zyklus erfasst werden.

2.8.3.1 Ermittlung der geeigneten Primer- und Sondenkonzentrationen

Zur Optimierung der qPCR wurden in einem Vorexperiment verschiedene Primer- und Sondenkonzentrationen gegeneinander ausgetestet. Dabei wurden für die Forward und Reverse Primer drei Konzentrationen (300; 600; 900 nM) in allen Kombinationen getestet. Im Anschluss daran wurde zusätzlich noch die optimale Sondenkonzentration ermittelt; dazu wurden ebenfalls drei verschiedene Konzentrationen (150; 200; 250 nM) getestet.

Damit sollte das Hybridisierungsverhalten der beiden Oligonukleotide sowie der verwendeten Sonden unter den gewählten Bedingungen bestimmt werden. Optimale Reaktionsbedingungen führen zu einer Verbesserung des Signalbildes. Außerdem sollte die Kombination gefunden

werden, bei der der niedrigste *Cycle Threshold* Wert (CT-Wert) erreicht wird. Der CT-Wert ist als der Teil der Kurve definiert, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals über die Fluoreszenz des Hintergrundwertes ansteigt.

2.8.3.2 Durchführung der qPCR

Die Durchführung der qPCR erfolgte in 96-Wellplatten in Triplikaten mit einem jeweiligen Reaktionsvolumen von 15 µL. Über Negativkontrollen, die alles außer der cDNA enthielten, wurden Kontaminationen der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen. Die Amplifikation erfolgte in drei Schritten (1 x 95 °C / 5'; 40 x 95 °C / 3''; 60 °C / 30''; 72 °C / 26'').

Die Auswertung der qPCR Daten erfolgte nach der absoluten Quantifizierungsmethode mithilfe einer Standardkurve. Hier wird die Expression des Zielgenes auf die absolute Startkopienzahl oder Startkonzentration bezogen. Für diese Methode benötigt man eine Kalibrierungskurve, die auf einer Verdünnungsreihe eines Standards basiert. Somit kann die RNA-Konzentration des Zielgenes quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit dienten kommerziell erworbene Hirnstamm-RNA (Maus) bzw. Nebennieren-RNA (Human) für die Herstellung des Standards für die Standardkurve der absoluten Quantifizierung.

Zur Herstellung der Standardkurve wurde die kommerziell erworbene RNA mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben (wie unter 2.8.2. beschrieben). Anschließend erfolgte eine Amplifikation mittels qPCR und die Aufreinigung der DNA mithilfe des „*High Pure PCR Product Purification Kit*“. Die Aufreinigung erfolgte nach Vorgaben des Herstellers; darauffolgend wurde die Konzentration der DNA photometrisch ermittelt und eine Stammlösung (1 ng/mL) hergestellt. Aus der Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese im Anschluss in die qPCR eingesetzt. Die nachfolgende Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Standardkurve.

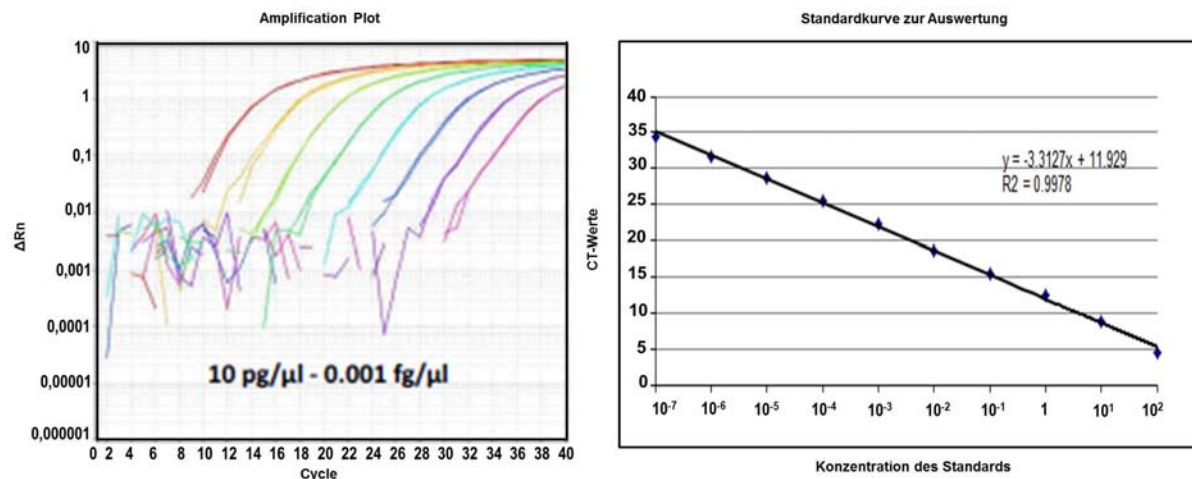


Abbildung 5: Verlauf der Standardkurve für die absolute Quantifizierung der qPCR

Bei der absoluten Quantifizierung der qPCR wird die Expression des Zielgenes auf die Startkonzentration bezogen. Für die Auswertung der qPCR wurde eine Verdünnungsreihe aus der kommerziell erworbenen Nebennieren-RNA (Human) bzw. Hirnstamm-RNA (Maus) hergestellt. Diese Verdünnungsreihe wurde als Standardkurve bei der Durchführung der qPCR eingesetzt (A). Zur Auswertung der qPCR wurde eine Geradengleichung der CT-Werte des Standards erstellt (B). Durch die Geradengleichung kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden.

Zur Kontrolle der qPCR wurden die Amplifikationsprodukte in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden 3 %ige Gele mit 10 μg/ml Ethidiumbromid verwendet und nach Auftrennung in 1x TAE bei 5 V/cm für 45 min. unter 320 nm UV fotografiert.

2.9 Neurochemische Methoden

2.9.1 Analytischer Nachweis von Noradrenalin

Um die Ergebnisse der Stimulationsexperimente *in vitro* sowie der Virusinfektionen zu verifizieren, wurde die Noradrenalkonzentration in Leukozyten und im Milzgewebe bestimmt.

Der Nachweis von Katecholaminen erfolgt heute vorwiegend über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. „*high pressure liquid chromatography*“, HPLC) in Verbindung mit einer chemischen Detektion. Die Durchführung der Noradrenalinbestimmung im Milzgewebe erfolgte in der Arbeitsgruppe Immunphysiologie am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Adriana del Rey. Die Noradrenalinbestimmung in den Leukozyten der Milz erfolgte in der Arbeitsgruppe Experimentelle und Klinische Pharmakologie der Universität Insubria (Varese, Italien) unter der Leitung von Prof. Dr. Marco Cosentino. Im Folgenden soll das Prinzip der HPLC sowie der chemischen Detektion kurz erläutert und deren Ergebnisse als Teil dieser Arbeit angeführt werden.

2.9.1.1 HPLC mit elektrochemischer Detektion

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem ein Substanzgemisch in seine Einzelbestandteile aufgetrennt und anschließend detektiert wird. Die zusätzliche Verwendung eines elektrochemischen Detektors bedient sich der Oxidations-Reduktions-Methode und ermöglicht eine simultane Messung und Analyse von mehreren Katecholaminen.

Für den Nachweis von Noradrenalin wurden die Proben zunächst gewogen und mit 0,4 M eiskalter Perchlorsäure im Verhältnis 1 : 20 homogenisiert. Der Aufschluss der Proben erfolgte mittels Sonikation unter Einsatz der Mikrospritze MS 72. Gewählt wurden als Taktung (Cyde) 50 % und 70 % der Maximalenergie. Sonikiert wurde dreimal jeweils für 3 sek. Im Anschluss daran wurden die Proben 10 sek. gemischt und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min. bei 4° C zentrifugiert. Für die Messung der Proben mittels HPLC wurden 100 µL der Überstände in Mikrovials eingefüllt, diese wurden in Adaptorröhrchen platziert, mit Septen versehen und verschraubt. Die Proben wurden zusammen mit definierten Standards, welche ein 10^{-7} M Gemisch der zu analysierenden Substanzen enthielten, zur Messung in den Autosampler gestellt. Ein Probenvolumen von 10 µL wurde in das HPLC-System injiziert und über die Säule getrennt. Die separierten Substanz-Ausschläge wurden anhand der Retentionszeiten identifiziert und über die Ausschlaghöhe quantifiziert.

2.10 Tierexperimentelle Methoden

2.10.1 Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus

Das erstmals 1957 beschriebene Retrovirus Friend gehört zur Familie der murinen Leukämieviren und besteht aus den apathogenen replikationskompetenten F-MuLV (*Friend Murines Leukämievirus*) und dem pathogenen, jedoch replikationsunfähigen, SFFV (*spleen focus forming virus*) (Friend, 1957). Größere Deletionen im *gag*-Gen verhindern, dass der SFFV virale Partikel bilden kann. Eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zu einer Verpackung der RNA von SFFV in F-MuLV-kodierte Viruspartikel und somit zur Verbreitung von SFFV. Bei adulten Mäusen induziert eine Infektion mit beiden Viren eine Splenomegalie (Dittmer *et al.*, 2002). Targetzellen für den FV sind Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (Dittmer *et al.*, 2002). Auf diesen Zellen bindet F-MuLV an den Rezeptor Pit-1/2 (*inorganic phosphate transporter*), wohingegen der Rezeptor für SFFV bislang unbekannt ist (DeLarco *et al.*, 1976). Durch die Bindung des Virus an den Rezeptor exprimieren die infizierten Zellen ein defektes *env*-kodierendes Glykoproteine gp55 auf ihrer Oberfläche. Dieses Glykoprotein bindet an den Erythropoetin

(Epo)-Rezeptor, der sich auf kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen befindet. Diese Bindung induziert ein polyklonales Proliferationssignal (Kabat *et al.*, 1989; D'Andrea *et al.*, 1992). Das falsche Proliferationssignal regt Erythrozytenvorläuferzellen zur Proliferation an, wobei ein Virusreservoir entsteht. Im weiteren Verlauf der Infektion wird das Provirus in das Wirtszellgenom eingebaut (Moreau-Gachelin *et al.*, 1998; Moreau-Gachelin *et al.*, 2008).

Eine Friend Virus-Infektion ist für den verwendeten Mausstamm C57BL/6 nicht letal. Er ist in der Lage, eine starke Immunantwort gegen das Virus aufzubauen. Die Tiere entwickeln eine leichte Splenomegalie, die sich allerdings bereits nach zwei bis drei Wochen wieder zurückbildet. Die Tiere sind jedoch nicht in der Lage, das Virus vollständig zu eliminieren und bleiben somit chronisch infiziert, haben aber dennoch eine normale Lebenserwartung. Die Infektion der C57BL/6 Mäuse erfolgte in den Tierlaboren des Institutes für Virologie am Universitätsklinikum Essen. Empfängertiere wurden mit jeweils 20.000 *Spleen focus forming Units* (SFFU) injiziert. Das Virus wurde in sterilem PBS verdünnt und intravenös (i. v.) in die laterale Schwanzvene injiziert.

2.10.2 Chemische Sympathektomie

Das 6-OHDA ist ein Neurotoxin, welches über DAT und NAT in katecholaminerge Neurone aufgenommen wird. Innerhalb der Neurone akkumuliert 6-OHDA im Zytosol oder den Mitochondrien (Schober *et al.*, 2004). Die systemische Gabe von 6-OHDA führt zu einer Zerstörung sympathischer Nervenendigungen in der Peripherie mit konsekutivem Noradrenalinverlust im peripheren Nervensystem (Thoenen *et al.*, 1968). Eine Applikation von 6-OHDA in der Peripherie führt zu keiner Veränderung im ZNS, da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Entscheidend für die Neurotoxizität des Neurotoxins scheint die Entstehung von oxidativem Stress zu sein. *In-vitro*- und *in-vivo*-Studien konnten diesen oxidativen Stress durch 6-OHDA belegen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterliegen Dopamin und 6-OHDA den gleichen Abbauwegen. Somit scheinen zwei Mechanismen für die Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies (engl. „*Reactive Oxygen Species*“, ROS) entscheidend zu sein: die Desaminierung durch MAO und die nicht-enzymatische Autooxidation (Blum *et al.*, 2001). Dabei entstehen Wasserstoffperoxid, Superoxid und Hydroxylradikale. Auch die mitochondriale Funktion wird durch 6-OHDA beeinträchtigt, was ebenfalls zur Toxizität des Neurotoxins beiträgt (Glinka *et al.*, 1997). Der oxidative Stress führt zu DNA-Defekten, Lipidperoxidationen und Desorganisation des Zytoskeletts sowie einer Hemmung der mitochondrialen Funktion. Dies mündet schlussendlich im Zelltod (Blum *et al.*, 2001).

Um die Beteiligung des SNS am Verlauf einer Friend Virus-Infektion sowie ihre Wirkung auf die Enzyme des Katecholaminmetabolismus untersuchen zu können, wurden den Mäusen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 150 mg/kg in Isoascorbinsäure verdünntes 6-OHDA intraperitoneal (i. p.) injiziert. Nach einem Tag Pause wurden die Mäuse entweder mit dem FV infiziert (FV/6-OHDA) oder erhielten als Kontrollen eine PBS-Applikation (PBS/6-OHDA). Zusätzlich wurden Mäuse entweder nur mit FV infiziert (FV/Veh) oder nur mit PBS behandelt (PBS/Veh).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der qPCR - Vergleich der Expression von Referenzgenen -

Zu Beginn der Arbeit wurden zunächst die Methoden etabliert und optimiert. Dies betraf die Ermittlung der optimalen Primer- und Sondenkonzentrationen sowie die Auswahl geeigneter Referenzgene und das Auswertefahren.

Die ermittelten Primer- und Sondenkonzentration können nachfolgender Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Ermittelte Endkonzentrationen der verwendeten Primer und Sonden

Gen	Organismus	Forward Primer [nM]	Reverse Primer [nM]	Sonde [nM]
DBH	Maus	300	300	250
COMT	Maus	900	900	250
MAO-A	Maus	900	900	150
PNMT	Maus	900	900	200
TH	Maus	900	900	150
COMT	Human	900	900	250
MAO-A	Human	600	600	200

Quantitative PCR-Daten können relativ oder absolut ausgewertet werden. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgenes mit der eines konstitutiv exprimierten Referenzgens verglichen. Dies ist die am weitesten verbreitete Methode zur Normalisierung zellulärer mRNA-Daten. Allerdings werden mögliche Fehlerquellen in der Analyse der PCR-Daten kontrovers diskutiert; so kann beispielsweise die unkritische Auswahl von Referenzgenen zu einer Verzerrung der Ergebnisse und somit zu einer falschen quantitativen Aussage führen (Bustin *et al.*, 2009; Kitchen *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Diskussion in der Literatur über die Aussagekräftigkeit von Referenzgenen sowie hinsichtlich der Forderungen nach mehr Einheitlichkeit in der Durchführung und Auswertung von PCRs sollte eine absolute Quantifizierung der Referenzgene erfolgen. Von der relativen Quantifizierung ist die absolute Quantifizierung zu unterscheiden, bei der die absolute Startkopienzahl bestimmt wird. Dies erfordert für jeden Lauf die Erstellung einer Standardkurve anhand einer Verdünnungsserie mit bekannter Kopienzahl des jeweiligen Referenzgens. Um einen Vergleich der Expression zwischen Geweben und Zellen zu gewährleisten, wurden die Standardkurven für die Referenzgene in Hirnstamm, Nebenniere und Leukozyten der Milz verglichen. Aufgrund von Lite-

raturrecherchen wurden als Referenzgene das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie das Strukturprotein beta-Aktin (β -Aktin) ausgewählt.

Die GAPDH-Expression (Abbildung 6 A) war in isolierten Milzleukozyten um das 3,4-fache niedriger als in der Nebenniere und 10-fach niedriger als im Hirnstamm. Die β -Aktin-Expression (Abbildung 6 B) war in den Leukozyten der Milz 1,1-fach höher als in der Nebenniere und um das 1,2-fache niedriger als im Hirnstamm.

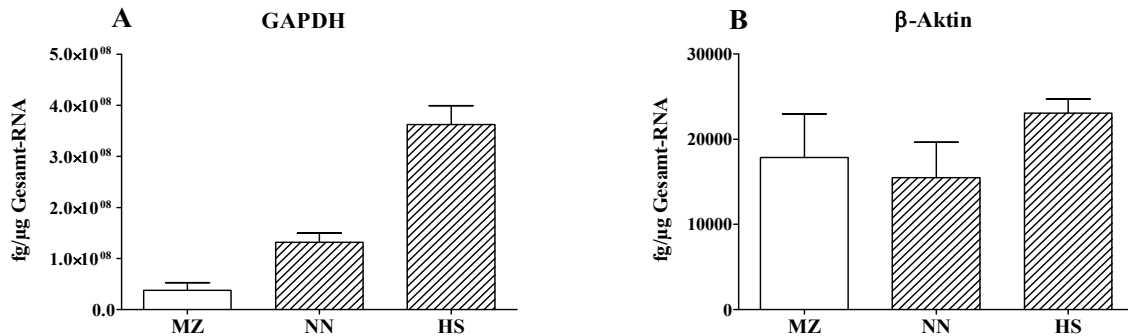


Abbildung 6: Vergleich der Expression der Referenzgene GAPDH und β -Aktin in Leukozyten, Nebenniere und Hirnstamm

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der GAPDH (A) und β -Aktin (B) mRNA-Expression in Hirnstamm (HS; n = 4) und Nebennieren (NN; n = 4), sowie Milzleukozyten (MZ; n = 4). Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.2 Charakterisierung der konstitutiven mRNA-Expression von Enzymen für Katecholaminsynthese und-abbau

Es wurde geprüft, ob auch Leukozyten der Milz und deren Subpopulationen die Enzyme des Katecholaminmetabolismus konstitutiv exprimieren und es eventuell Unterschiede in der Expressionsstärke gibt.

Dazu wurden die Zellen wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt isoliert.

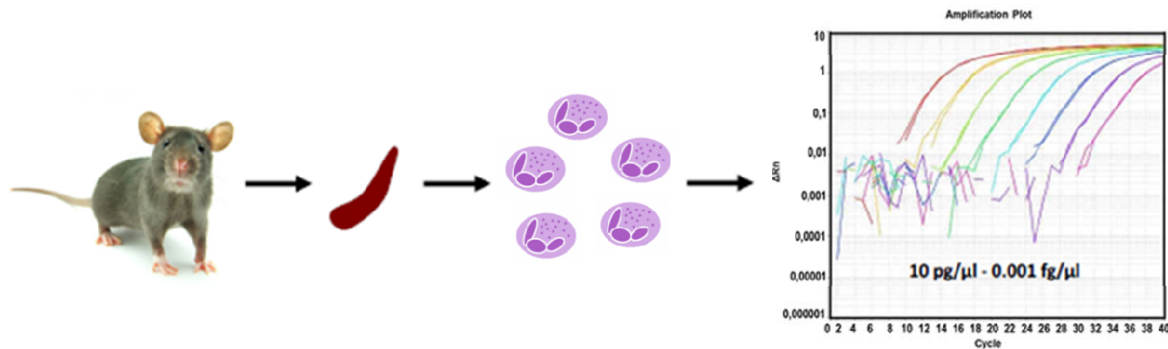


Abbildung 7: Versuchsaufbau der RNA-Expressionsanalyse in murinen Leukozyten der Milz

Aus adulten C57BL/6 Mäusen wurde die Milz entnommen, homogenisiert und eine Leukozytensuspension hergestellt. Für die Expressionsanalyse wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR absolut quantifiziert.

3.2.1 Enzymexpression in Leukozyten

Die konstitutive Expression der Enzyme für Synthese (TH, DBH und PNMT) und Degradierung (COMT und MAO-A) von Katecholaminen in Leukozyten konnte nachgewiesen werden (Abbildung 8). Es gab nur sehr geringfügige Unterschiede in der Expressionsstärke von TH, DBH, PNMT und MAO-A. Die Expression von COMT war jedoch 7-fach höher als die des ebenfalls degradierenden Enzymes MAO-A bzw. der synthetisierenden Enzyme.

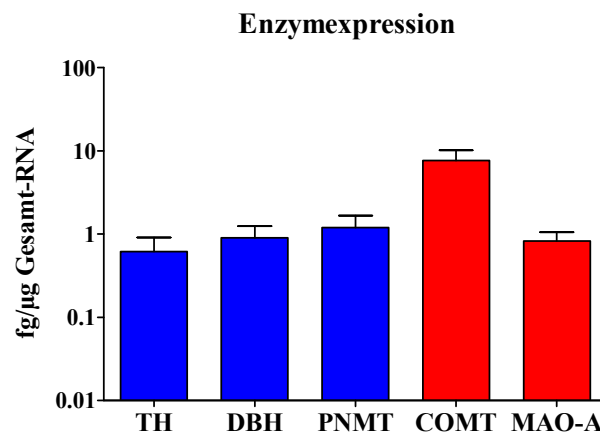


Abbildung 8: Konstitutive Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme in isolierten Leukozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der konstitutiven Expression der Enzyme für die Synthese (TH, DBH und PNMT [blaue Säulen]) sowie für die Degradierung (COMT und MAO-A [rote Säulen]) von Katecholaminen in Milzleukozyten (MZ; n = 4). Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.2.2 Überprüfung der qPCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Abbildung 9 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. Die Größe der Amplifikationsprodukte entsprach den auf Basis der Sequenz berechneten Fragmentlängen: 70 bp (TH; Spur 2), 98 bp (DBH; Spur 3), 87 bp (PNMT; Spur 4), 72 bp (COMT; Spur 5) und 100 bp (MAO-A; Spur 6).

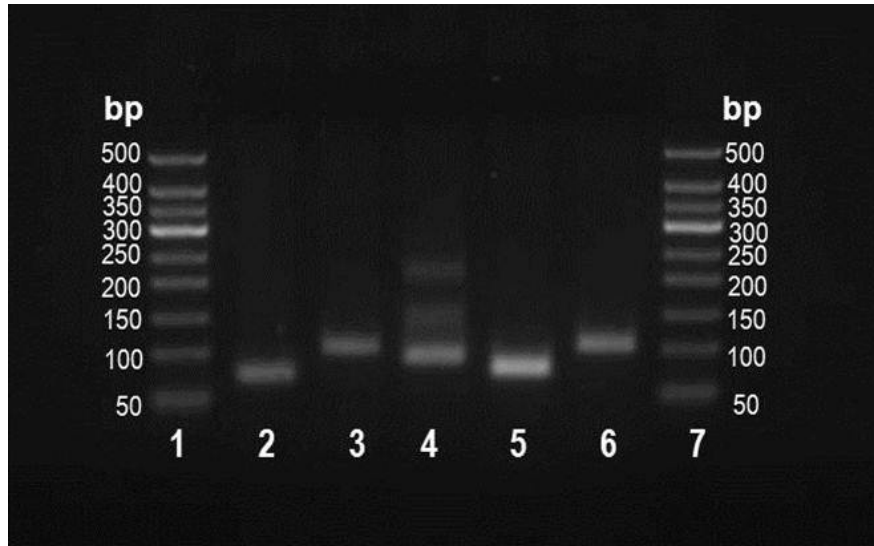


Abbildung 9: Agarose-Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels

Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt; gezeigt ist hier ein exemplarisches Gel. Die Produktgrößen wurden anhand eines DNA-Molekulargewichtsstandards (Spuren 1 und 7) identifiziert. Spur 2: TH (70 bp); Spur 3: DBH (98 bp); Spur 4: PNMT (87 bp); Spur 5: COMT (72 bp); Spur 6: MAO-A (100 bp).

3.2.3 Enzymexpression in Leukozytensubpopulationen

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse für verschiedene Leukozytensubpopulationen sind in Abbildung 10 dargestellt. Es wurden folgende Expressionsmuster ermittelt:

Für das Enzym TH (Abbildung 10 A): $CD11b^+$ myeloide Zellen > $CD90.2^+$ Gesamt-T-Zellen > $CD19^+$ B-Zellen > $CD4^+$ T-Helferzellen > $CD8^+$ T-Zellen > $CD4^+CD25^+$ T_{regs} > $CD4^+CD25^-$ T_{eff} .

Für das degradierende Enzym COMT (Abbildung 10 B): $CD11b^+$ myeloide Zellen > $CD8^+$ T-Zellen > $CD4^+$ T-Helferzellen > $CD4^+CD25^-$ T_{eff} > $CD19^+$ B-Zellen > $CD90.2^+$ Gesamt-T-Zellen > $CD4^+CD25^+$ T_{regs} .

Für das Enzym MAO-A (Abbildung 10 C): $CD8^+$ T-Zellen > $CD4^+CD25^+$ T_{regs} = $CD90.2^+$ Gesamt-T-Zellen > $CD11b^+$ myeloide Zellen > $CD4^+$ T-Helferzellen = $CD19^+$ B-Zellen = $CD4^+CD25^-$ T_{eff} .

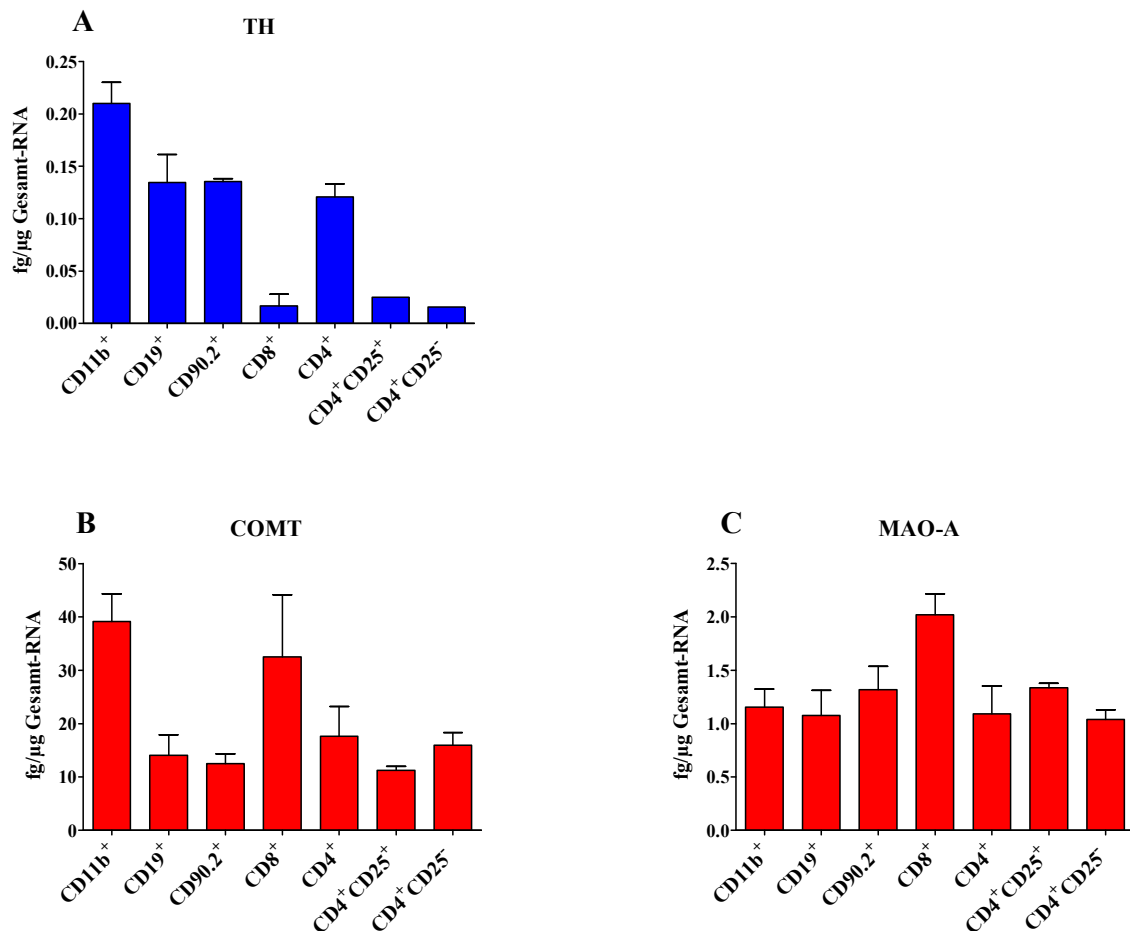


Abbildung 10: : Konstitutive Expression der Enzyme für Synthese und Degradierung von Katecholaminen in isolierten Leukozytensubpopulationen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der konstitutiven Expression der Enzyme TH (A; $n = 3$), COMT (B; $n = 3$) und MAO-A (C; $n = 3$) in verschiedenen Leukozytensubpopulationen. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert. Da bei einigen Subpopulationen nur in einem Teil der Proben ein Nachweis möglich war, bezieht sich der Mittelwert auf die jeweils separat angegebene Stichprobengröße. TH: CD8⁺ ($n = 2$); T_{regs} ($n = 1$); T_{eff} ($n = 1$). COMT und MAO-A: T_{regs} ($n = 2$).

3.2.4 Vergleich der Enzymexpression in verschiedenen Geweben

Klassische Orte der Katecholaminsynthese sind der Hirnstamm und die Nebenniere, jedoch nicht die Leukozyten aus der Milz. Für ein besseres physiologisches Verständnis der Expression dieser Enzyme in Leukozyten wurde die Expressionsstärke in den Milzleukozyten mit der Expression in den Geweben des Hirnstammes und der Nebenniere verglichen.

Der Vergleich der TH-, DBH- und PNMT-Expressionen (Abbildung 11 A, B und C) in den Leukozyten der Milz mit denen in den Geweben der Nebenniere und des Hirnstamm zeigte, dass die Expression in den Leukozyten rund 10^4 -fach geringer war als in der Nebenniere und 10^2 -fach geringer als die Expression im Hirnstamm.

Die COMT-Expression (Abbildung 11 D) war in den Milzleukozyten 10-fach geringer, als die Expression in den Geweben der Nebenniere und des Hirnstammes. Die MAO-A-Expression

(Abbildung 11 E) in den Milzleukozyten war 10^3 -fach geringer als die Expression in den beiden untersuchten Geweben.

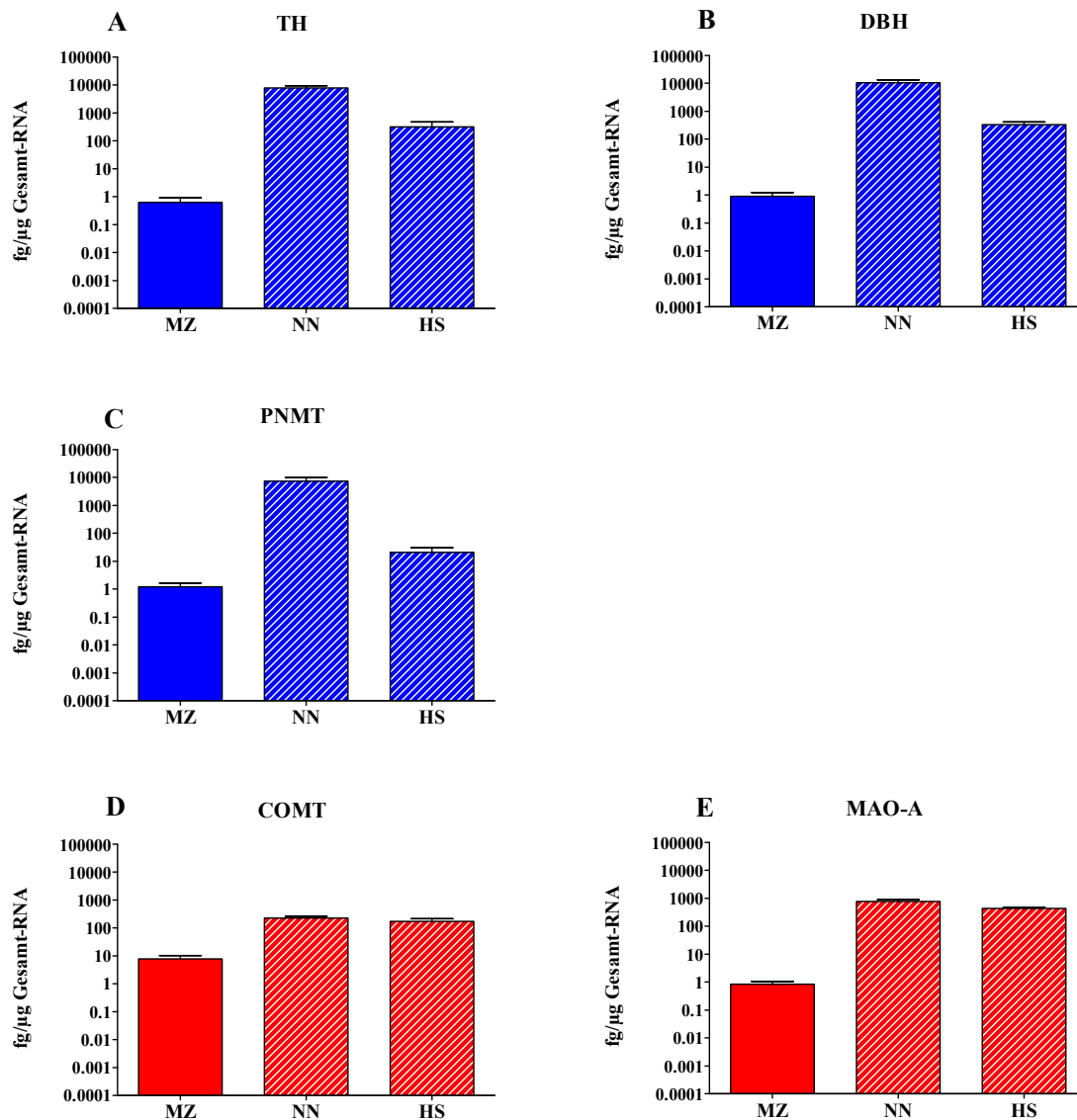


Abbildung 11: Konstitutive Expression der Enzyme für die Synthese und Degradierung von Katecholaminen in Milzleukozyten, Hirnstamm und Nebennieren

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der konstitutiven Expression der Enzyme für die Synthese (TH, DBH und PNMT [blaue Säulen]) sowie für die Degradierung (COMT und MAO-A [rote Säulen]) von Katecholaminen in Hirnstamm (HS; $n = 3$), Nebenniere (NN; $n = 4$) und Milzleukozyten (MZ; $n = 4$). Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.2.5 Zusammenfassung der konstitutiven Enzymexpression

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, aufzuklären, inwiefern die Enzyme des Katecholaminmetabolismus in Milzleukozyten, Leukozytensubpopulationen und den Geweben Hirnstamm und Nebenniere konstitutiv exprimiert werden und ob es darüber hinaus Unterschiede in der Expressionsstärke gibt.

Schlussendlich konnte gezeigt werden, dass die an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme in Milzleukozyten exprimiert werden, wobei COMT die höchste Expression vorwies. Beim Vergleich der Expression in verschiedenen Leukozyten-subpopulationen wiesen die CD11b⁺-myeloiden Zellen für TH und COMT die höchste Expression auf, während die höchste MAO-A-Expression in den CD8⁺ T-Zellen auftrat. Hingegen wurde bei den Untersuchungen zum Gewebevergleich die Enzyme für Synthese und Degradierung von Katecholaminen in Leukozyten der Milz geringer exprimiert als in der Nebenniere oder im Hirnstamm.

3.3 Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels in aktivierten Immunzellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer Immunaktivierung auf die Kinetik der Enzymexpression untersucht. Dazu wurde die Expression der degradierenden Enzyme über einen Zeitraum von 48 h nach erfolgter T- und B-Zellaktivierung analysiert.

3.3.1 Expressionskinetik in Milzleukozyten

Nach einer Stimulation war nur der Nachweis der degradierenden Enzyme auf mRNA-Ebene möglich; von den Synthesenzymen konnte nur PNMT nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine *in vitro* induzierte T-Zellaktivierung bzw. B-Zellaktivierung durch die entsprechenden Antikörper führte zu einem transienten Anstieg der COMT-Expression (Abbildung 12 A). Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen wurde in den anti-CD3 mAK-stimulierten Zellen nach 24 h Stimulation das höchste COMT-Expressionslevel detektiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression in den stimulierten Zellen um das 3,8-fache höher. Eine B-Zellaktivierung führte ebenfalls nach 24 h zum höchsten COMT-Expressionslevel und war um das 2,4-fache höher als in den Kontrollen. Die T-Zellaktivierung führte somit zu einer 2-fach höheren COMT-Expression als die B-Zellaktivierung.

Eine Zellaktivierung durch anti-CD3 mAK und anti-CD40/anti-IgM F(ab')₂ mAK führte ebenfalls zu einem transienten Anstieg der MAO-A-Expression (Abbildung 12 B). Die über T-Zellen aktivierten Leukozyten wiesen nach der 24-stündigen Stimulation eine 5-fach höhere MAO-A-Expression auf als die unbehandelten Kontrollen. Eine B-Zellaktivierung zeigte bereits nach 12 h eine 6-fach erhöhte MAO-A-Expression. Der Vergleich zwischen T- und B-Zellaktivierung zeigte, dass die höchste MAO-A-Expression nach anti-CD40/anti-IgM F(ab')₂ mAK-Stimulation ihr Expressionsmaximum früher erreichte als nach einer anti-CD3 mAK-Stimulation.

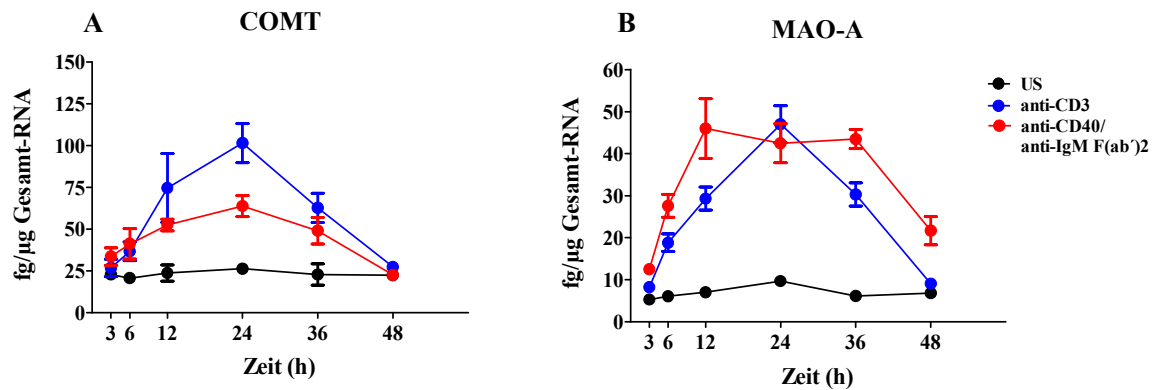


Abbildung 12: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD40/anti-IgM F(ab')2 mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Expressionskinetik der Enzyme COMT (A; $n = 3$) und MAO-A (B, $n = 3$) in unstimulierten (US; schwarze Kurve) und antigenstimulierten (anti-CD3 mAK; blaue Kurve bzw. anti-CD40/anti-IgM F(ab')2 mAK; rote Kurve) Milzleukozyten. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.3.2 Expressionskinetik in murinen T- und B-Lymphozyten

Die in Kapitel 3.3.1 geschilderten Experimente hatten gezeigt, dass sowohl eine T-Zellaktivierung als auch eine B-Zellaktivierung einen transienten Anstieg der COMT- und MAO-A-Expression in den Leukozyten induzierte. In einem nachfolgenden Schritt sollte überprüft werden, ob es sich bei den gemessenen Daten tatsächlich um einen direkten Effekt der B- bzw. T-Zellen handelte oder aber um einen indirekten, durch die Aktivierung anderer Immunzellen vermittelten Effekt. Dazu wurde der Versuch der Zellaktivierung in isolierten Lymphozyten wiederholt.

Aufgrund der hohen Varianzen in den Proben kann nach Stimulation nur ein transienter Anstieg der COMT-Expression (Abbildung 13 A) in den B-Lymphozyten angenommen werden. Die höchste Expression wird nach 24 h Stimulation vermutet; zu diesem Zeitpunkt scheint sie um das 3-fache höher als in den nicht stimulierten Zellen.

Eine Stimulation der B-Lymphozyten zeigte auch bei der Expression von MAO-A (Abbildung 13 B) starke Schwankungen, so dass auch hier nur von einem Trend im transienten Anstieg gesprochen werden kann; dabei scheint die Expression 6 h nach Stimulation 6-fach höher zu sein als in den nicht stimulierten Zellen.

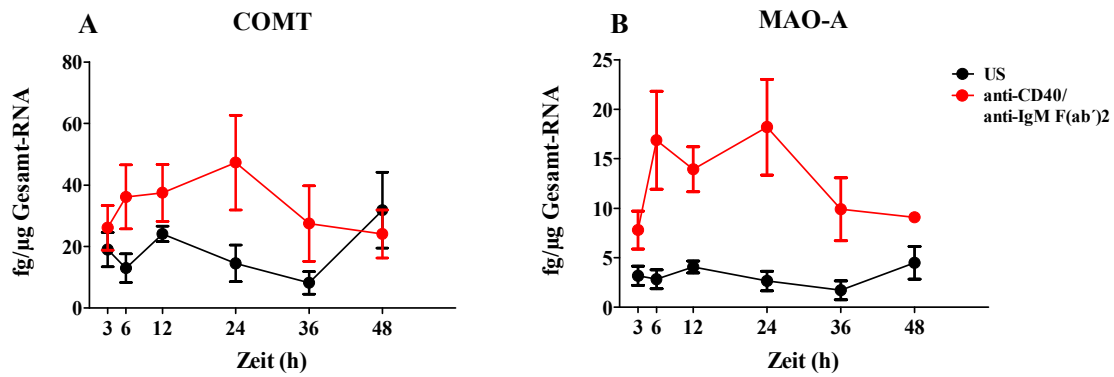


Abbildung 13: Effekte von anti-CD40/anti-IgM F(ab')₂ mAK auf die Expression von COMT und MAO-A in murinen B-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Expressionskinetik der Enzyme COMT (A; $n = 3$) und MAO-A (B, $n = 3$) in unstimulierten (US; schwarze Kurve) und antigenstimulierten (anti-CD40/anti-IgM F(ab')₂; rote Kurve) B-Lymphozyten. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

Auch die COMT-Expression (Abbildung 14 A) stieg nach einer Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/anti-CD28 mAK transient an. Das Expressionsmaximum, das dreimal höher in den stimulierten Zellen als in den unstimulierten Zellen war, konnte nach 24 h ermittelt werden. In den T-Lymphozyten führte eine Stimulation ebenfalls zu einem transienten Anstieg der Expression von MAO-A (Abbildung 14 B). Nach 24 h war die MAO-A Expression am höchsten und somit viermal größer als die nicht stimulierten Kontrollen.

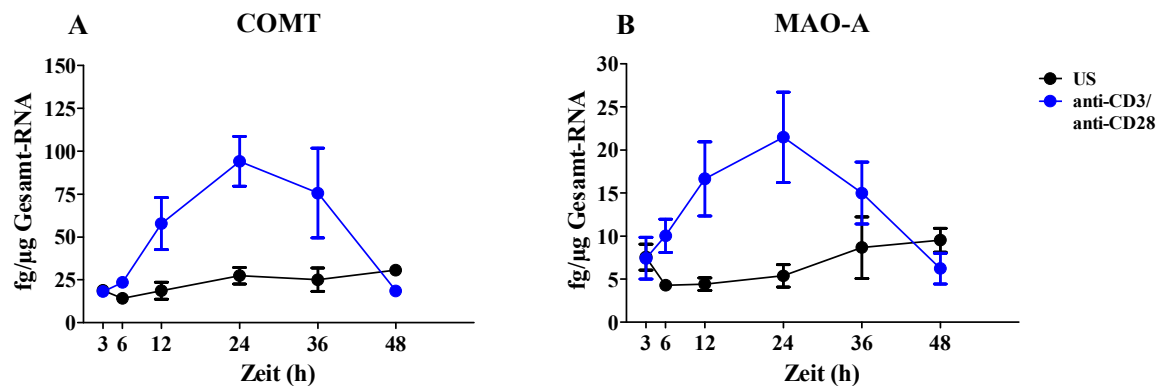


Abbildung 14: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD28 mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A in isolierten murinen T-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Expressionskinetik der Enzyme COMT (A; $n = 3$) und MAO-A (B, $n = 3$) in unstimulierten (US; schwarze Kurve) und antigenstimulierten (anti-CD3/anti-CD28; blaue Kurve) T-Lymphozyten. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.3.3 Einfluss einer T-Zellaktivierung auf die intrazelluläre Noradrenalkonzentration

Um diese Expressionsdaten zu validieren, wurde in einem zusätzlichen Experiment der Einfluss einer T-Zellaktivierung auf die Noradrenalkonzentration in Leukozyten untersucht (Abbildung 15).

Nach 48 h war die Konzentration in den mit anti-CD3 mAK stimulierten Zellen im Vergleich, zu den nicht stimulierten Zellen, um das 4-fache gesunken. In der nicht stimulierten Kontrolle hatte die Konzentration im Verlauf des Experimentes geringfügig zugenommen.

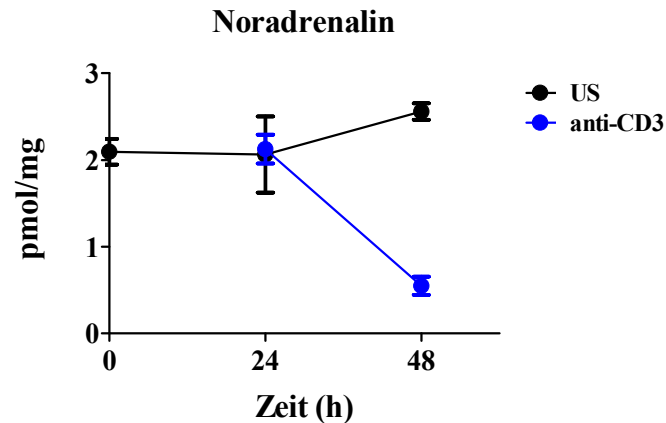


Abbildung 15: Effekte einer anti-CD3 mAK-Stimulation auf die Noradrenalkonzentration in isolierten Leukozyten der Milz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der intrazellulären Noradrenalkonzentration ($n = 3$) in unstimulierten (US; schwarze Kurve) und antigenstimulierten (anti-CD3 mAK; blaue Kurve) Milzleukozyten.

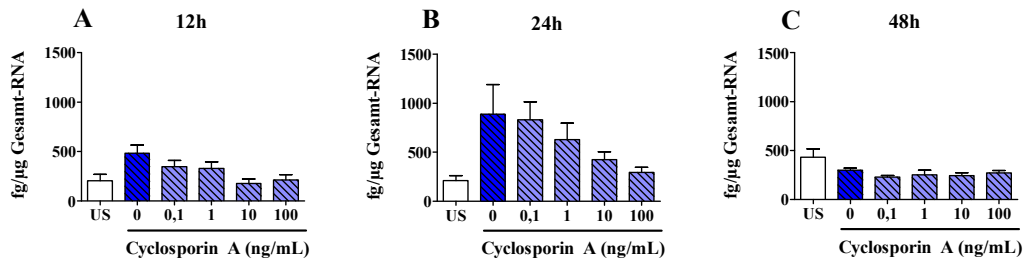
3.3.4 Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A in aktivierten Leukozyten

Um Hinweise für eine mögliche Verbindung des TCR-Signalweges und der Expression der katecholaminabbauenden Enzyme zu erhalten, wurde der Einfluss einer Calcineurininhibition auf die Genexpression untersucht.

Die durch anti-CD3 mAK hervorgerufene COMT-Expression (Abbildung 16 A bis C) in den Leukozyten wurde durch eine Zugabe von CsA supprimiert. Die Suppression ist von der CsA-Konzentration abhängig und war nur nach einer 24-stündigen Stimulation (Abbildung 16 B) zu beobachten. Bereits eine CsA-Konzentration von 0,1 ng/mL führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Reduktion der COMT-Expression um 7 %. Die stärkste Suppression der anti-CD3 mAK-induzierten COMT-Expression betrug 66,98 % bei einer CsA-Konzentration von 100 ng/mL. Zu den Zeitpunkten 12 und 48 h (Abbildung 16 A und C) gab es keinen Unterschied im COMT-Expressionsniveau.

Für die mit anti-CD3 mAK-induzierte MAO-A-Expression (Abbildung 16 D bis F) wurde hingegen eine Suppression sowohl 12 h als auch 24 h nach der Stimulation beobachtet. Nach 48 h war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Abbildung 16 F). Im Vergleich zur Kontrolle war die MAO-A-Expression (Abbildung 16 E) bereits bei der niedrigsten CsA-Konzentration (0,1 ng/mL) nach 24 h um 13 % reduziert; bei 100 ng/mL CsA betrug die Reduktion 80 %.

COMT



MAO-A

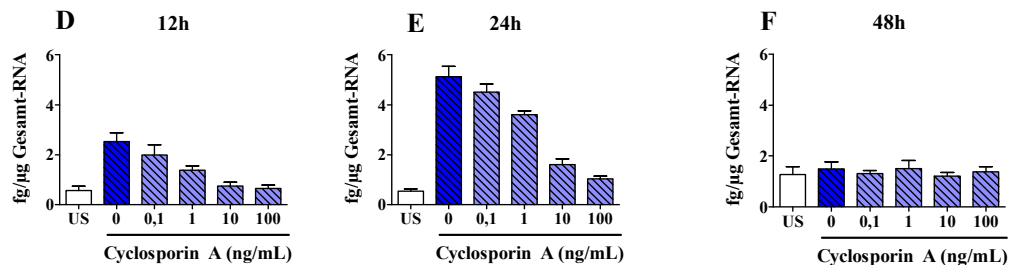


Abbildung 16: Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A in T-Zell-aktivierten Leukozyten der Milz

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der COMT (A bis C; $n = 5$) und MAO-A (D bis F; $n = 5$) mRNA-Expression in unstimulierten (US) und antigenstimulierten (anti-CD3 mAK) Milzleukozyten über einen Zeitraum von 48 h. Zusätzlich wurde der Einfluss steigender Konzentrationen von CsA auf die antigeninduzierte COMT und MAO-A Expression untersucht. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

Als zusätzliche Kontrolle dienten Leukozyten, die nur mit verschiedenen CsA-Konzentrationen inkubiert worden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Effekte einer Calcineurininhibition auf die Expression von COMT und MAO-A

Gen	Zeit (h)	Unstimuliert	0,1 ng/mL CsA	1 ng/mL CsA	10 ng/mL CsA	100 ng/mL CsA
COMT	12	205,2 ± 63,49	247,3 ± 17,49	212,4 ± 35,87	205,1 ± 43,07	181,7 ± 36,80
	24	210,2 ± 50,31	238 ± 57,39	180,9 ± 49,12	140,3 ± 41,69	151,6 ± 23,46
	48	433,5 ± 85,65	277,5 ± 54,41	257,4 ± 45,25	284,8 ± 93,54	222,5 ± 24,28
MAO-A	12	0,56 ± 0,17	0,57 ± 0,17	0,48 ± 0,08	0,41 ± 0,05	0,39 ± 0,05
	24	0,54 ± 0,09	0,61 ± 0,09	0,40 ± 0,12	0,33 ± 0,07	0,44 ± 0,07
	48	1,27 ± 0,31	0,84 ± 0,17	0,63 ± 0,14	0,62 ± 0,17	0,81 ± 0,08

Die Daten zeigten, dass das Immunsuppressivum CsA allein, das heißt in nicht gleichzeitig mit anti-CD3 mAK stimulierten Zellen, keinen Effekt auf die COMT und MAO-A Expression hatte.

3.3.5 Expressionskinetik in humanen T-Lymphozyten

Eine einfache Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen ist problematisch. Um artspezifische Effekte auszuschließen und Aussagen über die eventuelle Relevanz für den Menschen machen zu können, wurde der Einfluss der T-Zellaktivierung auf die Expression auch in humanen T-Lymphozyten untersucht. Dazu wurden die Zellen wie in Abbildung 17 dargestellt isoliert.

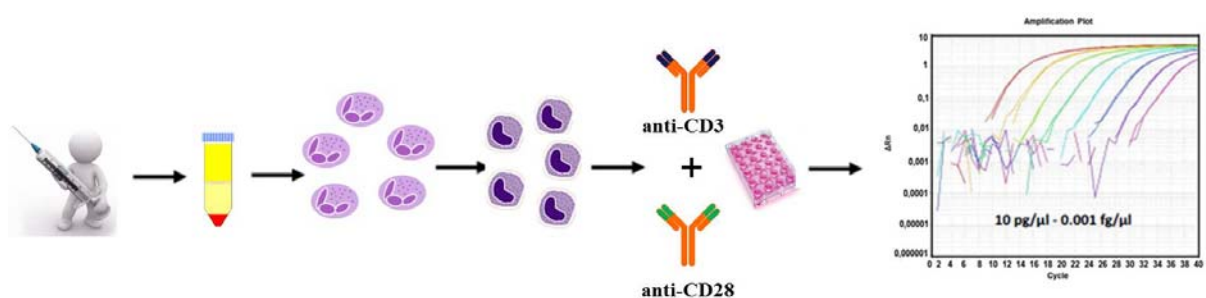


Abbildung 17: Einfluss einer *in-vitro*-T-Zellstimulation auf die Genexpression der an der Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme in humanen zirkulierenden T-Lymphozyten

Aus dem Vollblut der Spender wurden im ersten Schritt mittels Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen gewonnen. Die T-Zellen wurden im zweiten Schritt über eine negative immunmagnetische Selektion isoliert und mit immobilisierten anti-CD3 mAK und löslichem anti-CD28 mAK verschieden lang stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und die mRNA Expression von COMT und MAO-A mittels qPCR absolut quantifiziert.

Nach der Stimulation der zirkulierenden T-Lymphozyten mit anti-CD3/anti-CD28 mAK stieg die COMT-Expression an (Abbildung 18 A) und erreichte nach 24 h ihren höchsten Wert, der 3-fach größer war als in der nicht stimulierten Kontrolle. Die Expression von MAO-A (Abbildung 18 B) erreichte ebenfalls nach 24 h den höchsten Wert und war zu diesem Zeitpunkt zehnmal größer als in der Kontrolle.

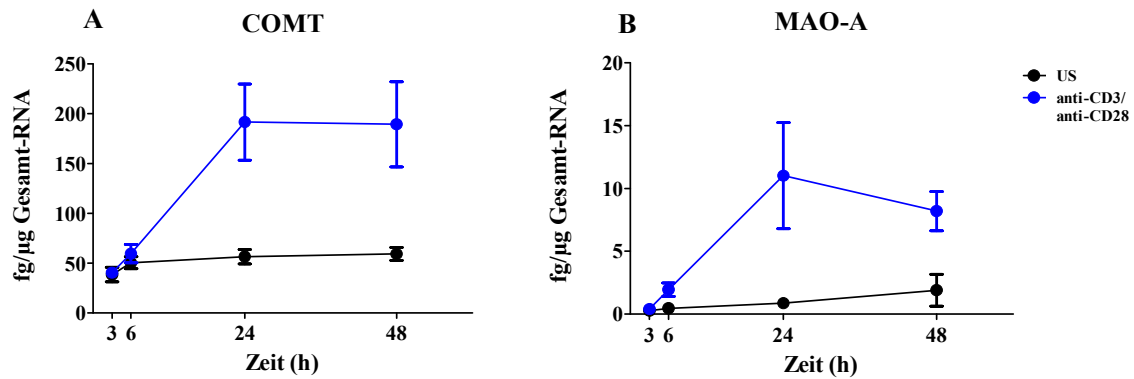


Abbildung 18: Effekte einer anti-CD3 mAK- und anti-CD28 mAK-Stimulation auf die Expression von COMT und MAO-A in humanen zirkulierenden T-Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Expressionskinetik der Enzyme COMT (A; $n = 3$) und MAO-A (B; $n = 3$) in unstimulierten (US; schwarze Kurve) und antigenstimulierten (anti-CD3 mAK/anti-CD28 mAK; blaue Kurve) humanen T-Lymphozyten nach verschiedenen Stimulationszeitpunkten. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert.

3.3.6 Zusammenfassung Immunaktivierung und Enzymexpression

Zur Einflussnahme einer T- und B-Zellaktivierung auf die Enzymexpression in Immunzellen ist bislang nichts bekannt. Die Zellaktivierung wurde anhand einer Zeitreihe untersucht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine T- und B-Zellaktivierung zu einem Anstieg der degradierenden Enzyme in Milzleukozyten führte, wobei auch hier die Expression von COMT höher war als die Expression von MAO-A. Ein Nachweis der synthetisierenden Enzyme war mittels qPCR nicht möglich. Ein Effekt einer B-Zellaktivierung auf den Anstieg der Expression der degradierenden Enzyme in murinen B-Lymphozyten konnte nur tendenziell beobachtet werden, während sowohl in murinen als auch humanen T-Lymphozyten ein Anstieg durch die T-Zellaktivierung induziert wurde. Ebenso konnte eine Reduktion der NoradrenalinKonzentration nach einer T-Zellaktivierung der Milzleukozyten aufgezeigt werden. Die durch eine T-Zellaktivierung induzierte Expression wurde durch eine Calcineurininhibition konzentrationsabhängig supprimiert.

3.4 Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes einer Friend Virus-Infektion

Basierend auf den *in-vitro*-Befunden wurde die Wirkungsweise einer Friend Virus-Infektion auf die Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels *in vivo* untersucht. Dazu wurde mit dem Friend Virus-Mausmodell gearbeitet und die Veränderungen der Enzymexpression an den Tagen 5, 10 und 15 nach einer FV-Infektion analysiert. Die Tiere, wurden wie in der nachfolgenden Abbildung 19 schematisch gezeigt, infiziert.

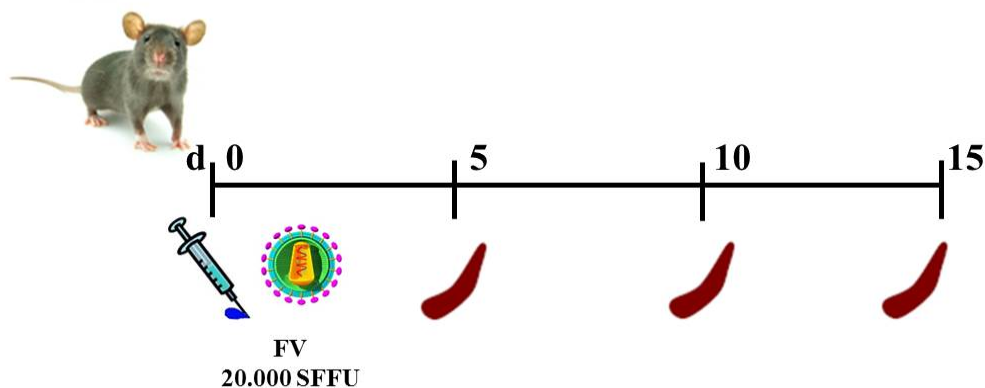


Abbildung 19: Versuchsablauf zur Untersuchung einer FV-Infektion

Adulten C57BL/6 Mäusen wurden mit 20.000 SFFU des FV i. v. in die laterale Schwanzvene infiziert (Tag 0). Den Kontrolltieren wurde nur PBS injiziert. Nach 5; 10 und 15 Tagen wurde den Mäusen die Milz entnommen und diese weiter untersucht.

3.4.1 Milzgewicht im Verlauf einer FV-Infektion

Das Milzgewicht ist ein Indikator, mit dem man den Verlauf einer FV-Infektion beurteilen kann, da das Virus eine polyklonale Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen induziert, die schließlich zu einer Splenomegalie führt. Zwischen den FV-infizierten Mäusen und den unbehandelten Kontrolltieren wurde an Tag fünf nach Infektion ein 1,4-facher Unterschied im Milzgewicht ermittelt (Abbildung 20). Zehn Tage nach Infektion waren die Milzen von infizierten Mäusen im Mittel doppelt so schwerer wie die der Kontrollen. Auch 15 Tage nach Infektion war die Milz der FV-infizierten Tiere im Mittel noch um das 1,7-fache schwerer als die der Kontrollen.

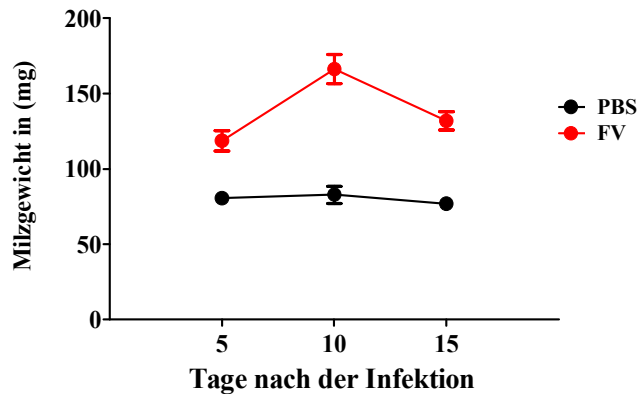


Abbildung 20: Veränderungen des Milzgewichtes im Verlauf einer FV-Infektion

Die rote Kurve repräsentiert die infizierten Tiere, während die schwarze Kurve die Kontrolltiere darstellt. Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden sieben Tiere in jeder Gruppe untersucht. Die Milzgewichte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.4.2 Enzymexpression im Verlauf einer FV-Infektion

Des Weiteren wurde die Auswirkung einer FV-Infektion auf die Expression der Enzyme des Katecholaminmetabolismus untersucht. Die Expression der synthetisierenden Enzyme TH, DBH und PNMT (Abbildung 21 A bis C) wiesen hohe Varianzen an allen drei Messzeitpunkten (Tage 5, 10 und 15 nach Infektion) auf. Daher kann keine valide Aussage über eventuelle Unterschiede in der Expression infizierter und nicht infizierter Tiere gemacht werden.

Hingegen löste die FV-Infektion bei den beiden degradierenden Enzymen COMT und MAO-A einen transienten Anstieg der Expression aus (Abbildung 21 D und E). Am Tag zehn nach Infektion war die COMT-Expression 2-fach und die MAO-A-Expression 2,5-fach erhöht.

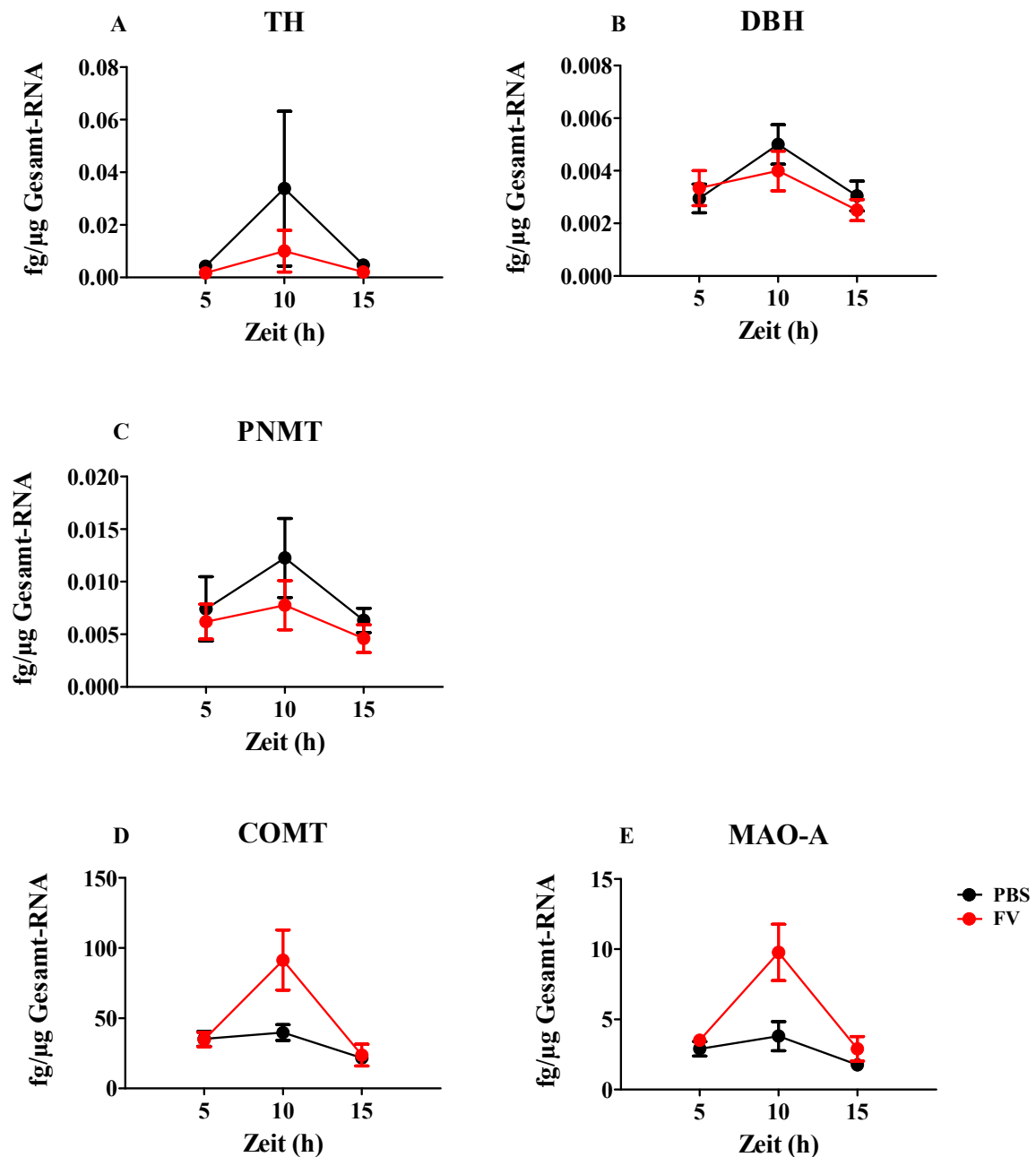


Abbildung 21: Expression der Enzyme für die Synthese und die Degradierung von Katecholaminen in Leukozyten während einer akuten FV-Infektion

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM des zeitliche Verlaufes der Enzymexpression in Milzleukozyten von FV-infizierten Mäusen (rote Kurve) und Kontrolltieren (schwarze Kurve). Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden sieben Tiere in jeder Gruppe untersucht. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert. Da bei einigen Zeitpunkten nur in einem Teil der Proben ein Nachweis möglich war, bezieht sich der Mittelwert auf die jeweils separat angegebene Stichprobengröße. TH: PBS 5 Tage (n = 4); PBS 10 Tage (n = 5); PBS 15 Tage (n = 4); FV 5 Tage (n = 2); FV 10 Tage (n = 5); FV 15 Tage (n = 5). DBH: PBS 10 Tage (n = 4); FV 5 Tage (n = 6); FV 10 Tage (n = 6); FV 15 Tage (n = 5). PNMT: PBS 10 Tage (n = 6); FV 15 Tage (n = 6).

3.4.3 Noradrenalinkonzentration im Milzgewebe im Verlauf einer FV-Infektion

Ebenso wurde die Noradrenalinkonzentration (Abbildung 22) im Milzgewebe im Verlauf einer FV-Infektion untersucht. An allen drei Untersuchungszeitpunkten war die Noradrenalinkonzentration in den FV-infizierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert. Zehn Tage nach Infektion war eine 3,4-fache Reduktion und damit die höchste Reduktion der Noradrenalinkonzentration in den infizierten Mäusen gegenüber den Kontrollen messbar.

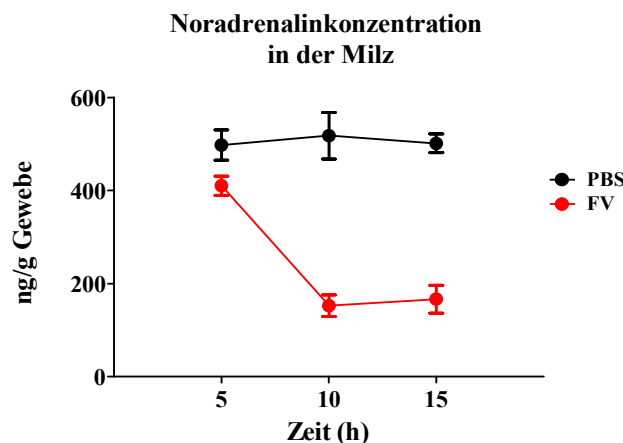


Abbildung 22: Auswirkungen des Verlaufes einer FV-Infektion auf die Noradrenalinkonzentration im Milzgewebe

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Noradrenalinkonzentration im Milzgewebe von FV-infizierten Mäusen (rote Kurve) und Kontrolltieren (schwarze Kurve). Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden sieben Tiere in jeder Gruppe untersucht.

3.5.4 Zusammenfassung Kinetik der FV-Infektion

Die Einflussnahme einer retroviralen Infektion auf die Enzymexpression des Katecholaminstoffwechsels wurde bislang noch nicht beschrieben. Das Modell der Friend Virus-Infektion stellte dafür ein geeignetes Untersuchungssystem dar. Zunächst galt es, den effektivsten Zeitpunkt nach der Infektion für die Untersuchungen zu bestimmen.

Abschließend lässt sich anhand der Ergebnisse des Milzgewichtes, der Enzymexpression und der Noradrenalinkonzentration sagen, dass zehn Tage nach der Infektion der effektivste Zeitpunkt für die Untersuchungen war. Des Weiteren stieg das Milzgewicht durch die Infektion der Mäuse an. Ebenso induziert die FV-Infektion einen Anstieg der Expression von COMT und MAO-A sowie eine Reduktion der Noradrenalinkonzentration.

3.5 Charakterisierung des Einflusses einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion

Um neuroimmunologische Wechselwirkungen nachzuweisen und die Rolle des SNS während der FV-Infektion zu bestimmen, wurde der Sympathikus durch eine chemische Sympathektomie ausgeschaltet. Dazu musste zunächst die Wirksamkeit der chemischen Sympathektomie nachgewiesen werden. Dazu wurde die NoradrenalinKonzentration über HPLC mit gleichzeitiger elektrochemischer Detektion ermittelt. Aufgrund der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Zeitreihe für die Expression wurde Tag zehn nach Infektion für diese Untersuchung gewählt. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 23 dargestellt.

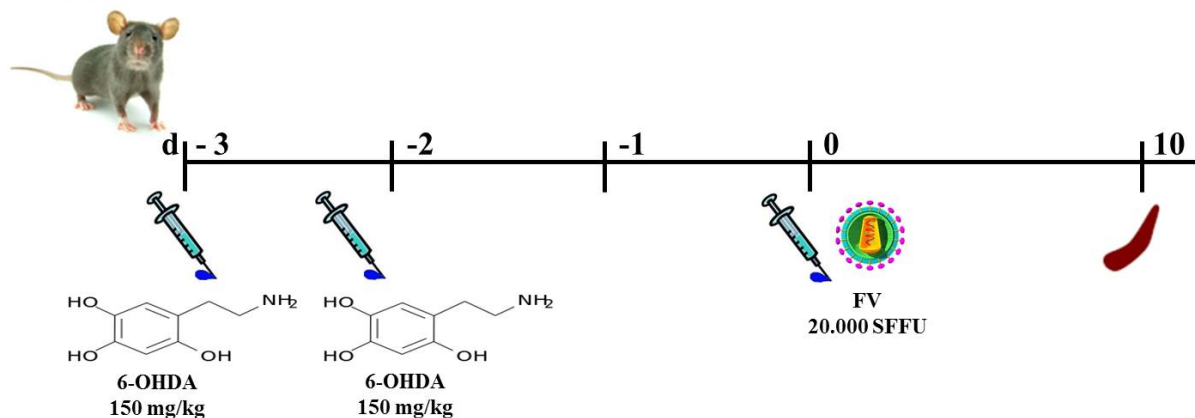


Abbildung 23: Versuchsablauf zur Untersuchung der Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf den Verlauf der FV-Infektion

Zur Zerstörung der catecholaminergen Nervenfasern in der Peripherie wurden adulten C57BL/6 Mäusen 150 mg/kg des Neurotoxins 6-OHDA an zwei aufeinander folgenden Tagen i. p. appliziert. Den Kontrolltieren wurde statt des Neurotoxins nur Isoascorbinsäure als Vehikel appliziert. Nach einem Tag Pause wurden die Mäuse zusätzlich mit 20.000 SFFU des FV infiziert. Die Kontrollgruppe für die FV-Experimentalgruppe wurde nur PBS appliziert. Zehn Tage nach Infektion wurden die Mäuse getötet, die Milz entnommen und für die verschiedenen Analysen aufgearbeitet.

3.5.1 NoradrenalinKonzentration in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

Die chemische Sympathektomie (PBS/6-OHDA) führte zu einer Verringerung des Noradrenalinhalt um bis zu 86 % im Vergleich zu naiven PBS behandelten Tieren (PBS/Veh) (Abbildung 24). Die NoradrenalinKonzentration von FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) war gegenüber den Kontrollen (PBS/Veh) um 82 % reduziert. Das Milzgewebe von FV-infizierten sympathektomierten Versuchstieren (FV/6-OHDA) wies eine Reduktion der NoradrenalinKonzentration um 81 % gegenüber FV-infizierten Tiere mit einer intakten catecholaminergen Innervation (FV/Veh) auf. Die Gegenüberstellung der Sympathektomie in infizierten Tieren (FV/6-OHDA) und nicht infizierten sympathektomierten Tieren (PBS/6-OHDA) zeigte eine Reduktion um 76 %.

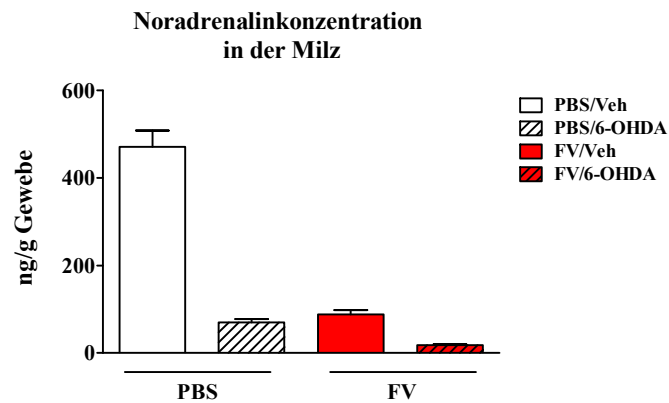


Abbildung 24: Einfluss einer sympathischen Sympathektomie auf die NoradrenalinKonzentration im Milzgewebe von FV-infizierten Mäusen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der NoradrenalinKonzentration im Milzgewebe von FV-infizierten Mäusen (FV/VEH; rote Säulen; $n = 9$), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (FV/6-OHDA; rot schraffierte Säulen; $n = 10$), nur mit PBS behandelten Mäusen (PBS/Veh; weisse Säulen; $n = 9$) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (PBS/6-OHDA; weiss schraffierte Säulen; $n = 10$).

3.5.2 Milzgewicht und Viruslast in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

Um die Auswirkungen der chemischen Sympathektomie auf den Verlauf der FV-Infektion näher zu untersuchen, wurden zunächst das Milzgewicht (Abbildung 25 A) und die Viruslast (Abbildung 25 B) ermittelt. Beide Parameter sind Indikatoren für den Verlauf einer FV-Infektion.

Die Milz von FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) war um das 1,4-fache schwerer als die Milz von PBS behandelten Kontrolltieren (PBS/Veh). Im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren führte die chemische Sympathektomie nur zu einer geringen Vergrößerung der Milz. Eine FV-Infektion in sympathektomierten Versuchstieren erhöhte das Milzgewicht. Bei den FV-infizierten sympathektomierten Mäusen war die Milz (FV/6-OHDA) um das 2,2-fache schwerer als bei FV-infizierten Tieren, die eine intakte catecholaminerge Innervation (FV/Veh) aufwiesen.

Die Viruslast nahm nach einer Zerstörung der catecholaminergen Nervenfasern (FV/6-OHDA) im Vergleich zu den nicht mit 6-OHDA behandelten FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) zu.

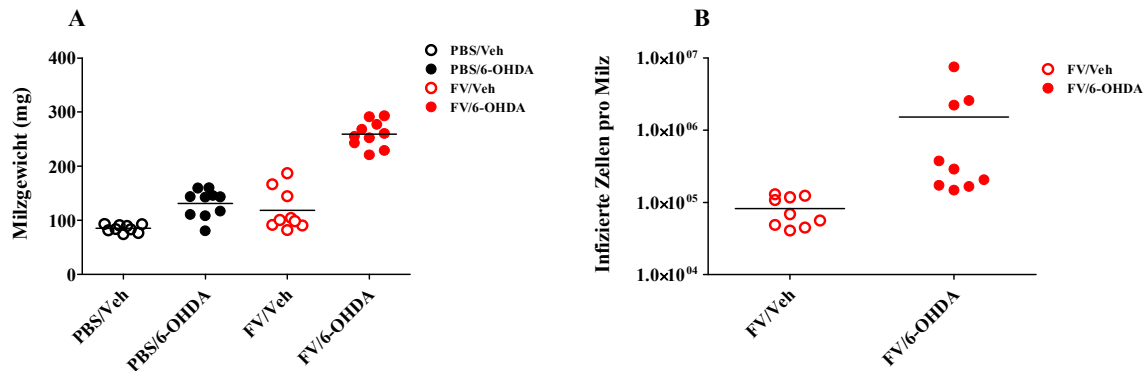


Abbildung 25: Einfluss der chemischen Sympathektomie auf die Milzgröße und Anzahl der infektiösen Zellen in FV-infizierten Mäusen

Dargestellt sind die Mittelwerte des Milzgewichtes (A) und der Viruslast (B) von FV-infizierten Mäusen (○; FV/VEH; $n = 9$), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (●; FV/6-OHDA; $n = 10$), nur mit PBS behandelten Mäusen (○; PBS/Veh; $n = 9$) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (●; PBS/6-OHDA; $n = 10$). Die Mittelwerte für jede Gruppe werden durch einen Querbalken dargestellt. Da bei einigen Analysen nur in einem Teil der Proben ein Nachweis möglich war, bezieht sich der Mittelwert auf die jeweils separat angegebene Stichprobengröße: FV/6-OHDA ($n = 9$).

3.5.3 Enzymexpression in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

In FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) nahm die Expression von TH und DBH (Abbildung 26 A und B) gegenüber den Kontrolltieren (PBS/Veh) ab. Eine chemische Sympathektomie veränderte bei keinem der beiden die Enzyme die Expression (PBS/Veh vs. PBS/6-OHDA). Vergleicht man die infizierten Versuchsgruppen untereinander (FV/Veh vs. FV/6-OHDA), so erkennt man eine Zunahme der Expression beider Enzyme nach der chemischen Sympathektomie. Eine FV-Infektion in den sympathektomierten Mäusen (FV/6-OHDA) hingegen führte im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (PBS/Veh bzw. PBS/6-OHDA) zu keinem Unterschied in der Expression.

Die Expression von PNMT (Abbildung 26 C) war in allen untersuchten Gruppen gleich.

Im Vergleich zu den PBS-Kontrollmäusen (PBS/Veh) wiesen FV-infizierte Mäuse eine höhere COMT-Expression auf (Abbildung 26 D). Auch in sympathektomierten PBS behandelten Mäusen (PBS/6-OHDA) war sie im Vergleich zur nicht sympathektomierten Kontrollgruppe (PBS/Veh) höher. Durch eine FV-Infektion in den sympathektomierten Mäusen (FV/6-OHDA) stieg die COMT-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie der ebenfalls infizierten Gruppe (PBS/6-OHDA und FV/Veh) an.

Die Analyse der MAO-A Expression (Abbildung 26 E) zeigte ebenfalls, dass die Expression in FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) höher war als in den Kontrolltieren (PBS/Veh). Ein Vergleich der Kontrollgruppen untereinander zeigte keinen Unterschied der MAO-A Expression. Allerdings stieg die MAO-A Expression in den FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (FV/6-OHDA) im Vergleich zu den nicht infizierten sympathektomierten Mäusen (PBS/6-

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine FV-Infektion zu einer Abnahme der synthetisierenden Enzyme TH und DBH führte, während sie in infizierten und gleichzeitig sympathektomierten Tieren anstieg. Die Expression der degradierenden Enzyme stieg nach FV-Infektion an und diese Zunahme wurde durch die Gabe von 6-OHDA noch verstärkt.

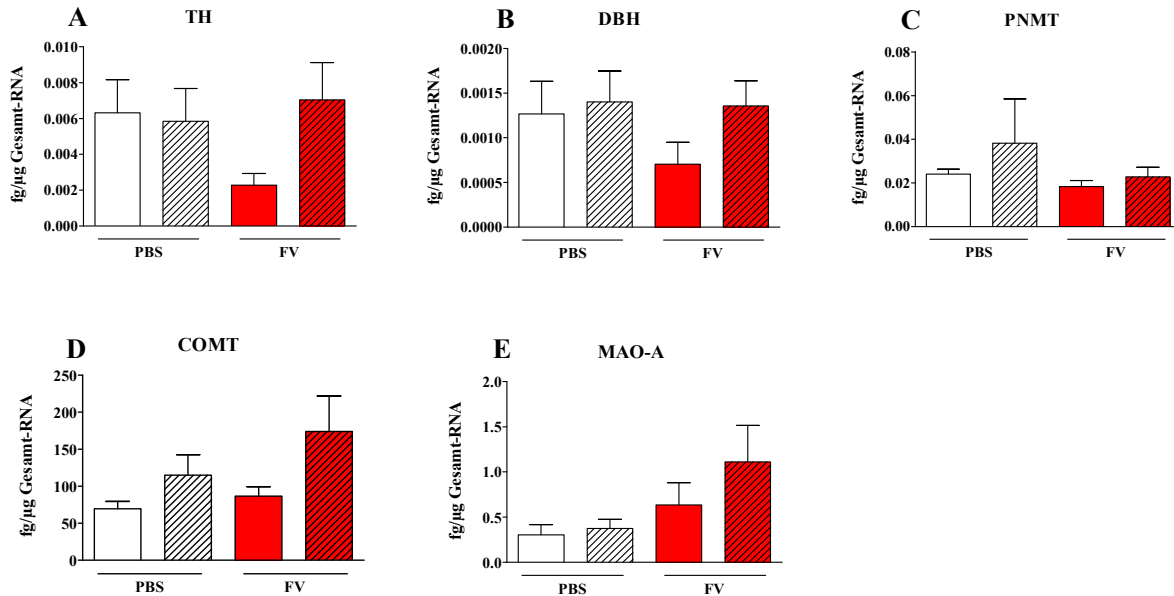


Abbildung 26: Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Enzymexpression in FV-infizierten Mäusen (FV/VEH; rote Säulen; $n = 9$), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (FV/6-OHDA; rot schraffierte Säulen; $n = 10$), nur mit PBS behandelten Mäusen (PBS/Veh; weisse Säulen; $n = 9$) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (PBS/6-OHDA; weiss schraffierte Säulen; $n = 10$). Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung analysiert. Da bei einigen Gruppen nur in einem Teil der Proben ein Nachweis möglich war, bezieht sich der Mittelwert auf die jeweils separat angegebene Stichprobengröße. TH: PBS/Veh ($n = 4$); PBS/6-OHDA ($n = 5$); FV/Veh ($n = 4$); FV/6-OHDA ($n = 5$). DBH: PBS/Veh ($n = 8$); PBS/6-OHDA ($n = 9$); FV/Veh ($n = 8$); FV/6-OHDA ($n = 6$).

3.5.4 Anzahl zytokinproduzierender T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

Ein eventueller Einfluss der Sympathektomie auf die Zytokinproduktion wurde durchflusszytometrisch untersucht.

Die FV-infizierten Mäuse (FV/Veh) wiesen gegenüber den Kontrollen (PBS/Veh) eine Zunahme der Anzahl an IFN- γ (Abbildung 27 A), TNF- α (Abbildung 27 B) und IL-2 (Abbildung 27 C) produzierenden T-Helferzellen auf. Eine zusätzliche chemische Sympathektomie der Kontrolltiere führte zu keinem Unterschied in der Anzahl zytokinproduzierender T-Helferzellen (PBS/6OHDA). Nur für TNF- α wurde eine leichte Zunahme nach Applikation von 6-OHDA beobachtet. Bei sympathektomierten und FV-infizierten Tieren war die Anzahl

der zytokinproduzierenden $CD4^+$ höher als in beiden Kontrollgruppen (FV/6-OHDA vs. PBS/Veh bzw. PBS/6OHDA), jedoch immer noch geringer als nach FV-Infektion (FV/Veh). Ebenso wurde die Anzahl an $IFN-\gamma$ (Abbildung 27 D), $TNF-\alpha$ (Abbildung 27 E) und $IL-2$ (Abbildung 27 F) produzierenden CTL untersucht. Ihre Zahl nahm in den FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) gegenüber den Kontrollen (PBS/Veh) zu. Zwischen der sympathektomierten Kontrollgruppe und der nicht sympathektomierten PBS-Kontrollgruppe gab es keinen Unterschied (PBS/VEH vs. PBS/6-OHDA). Die FV-infizierten sympathektomierten Mäuse zeigten für $IFN-\gamma$ und $IL-2$ eine Zunahme an zytokinproduzierenden CTL gegenüber den beiden Kontrollgruppen (PBS/Veh bzw. PBS/6-OHDA), allerdings war die absolute Anzahl geringer als in den FV-infizierten Mäusen (FV/VEH). Nur für $TNF-\alpha$ konnte in den sympathektomierten FV-infizierten Tieren (FV/6-OHDA) kein Unterschied zu den beiden PBS-Kontrollgruppen (PBS/Veh bzw. PBS/6-OHDA) oder der FV-infizierten Versuchsgruppe (FV/Veh) detektiert werden.

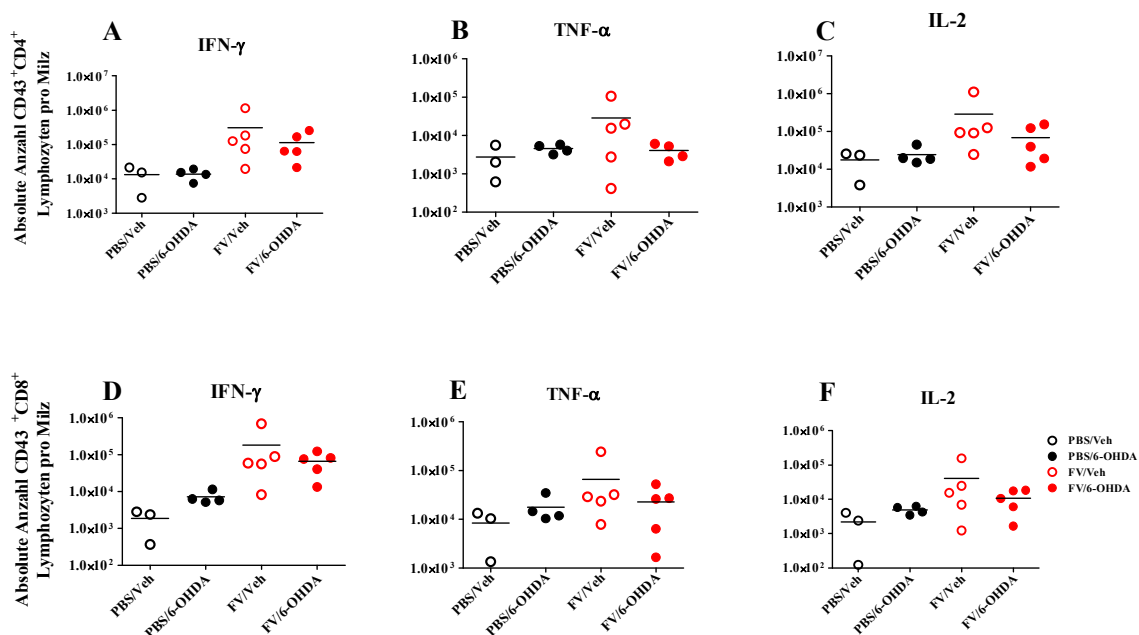


Abbildung 27: Auswirkung einer sympathischen Sympathektomie auf die Produktion der Zytokine $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $IL-2$ von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten von FV-infizierten Mäusen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl zytokinproduzierender T-Lymphozyten der Milz von FV-infizierten Mäusen (○; FV/VEH; n = 5), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (●; FV/6-OHDA; n = 5), nur mit PBS behandelten Mäusen (○; PBS/Veh; n = 3) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (●; PBS/6-OHDA; n = 4). Die Mittelwerte für jede Gruppe werden durch einen Querbalken dargestellt.

3.5.5 Funktion von $CD8^+$ T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

Der Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die Expression von Granzym B und Tetramer in CTLs wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren (PBS/Veh) nahm die absolute Anzahl an $\text{GzmB}^+ \text{Tet}^+$ CTL (Abbildung 28 A) und $\text{GzmB}^- \text{Tet}^+$ (Abbildung 28 B) in der Milz nach einer FV-Infektion (FV/Veh) zu. Wurden die PBS-Kontrollgruppe zusätzlich noch mit 6-OHDA (PBS/6-OHDA) behandelt, so führte diese Behandlung zu keinem Unterschied im Vergleich zur PBS/Veh-Gruppe. Im Gegensatz zu der sympathektomierten Kontrollgruppe (PBS/6-OHDA) löste die Sympathektomie in den FV-infizierten Tieren einen Anstieg der absoluten Anzahl an $\text{GzmB}^+ \text{Tet}^+$ bzw. $\text{GzmB}^- \text{Tet}^+$ CTL aus. Ein Vergleich mit der FV-infizierten sympathektomierten Gruppe (FV/ 6-OHDA) zeigte keinen Unterschied für die $\text{GzmB}^+ \text{Tet}^+$ CTL und eine geringere Reduktion gegenüber der FV/Veh Gruppe.

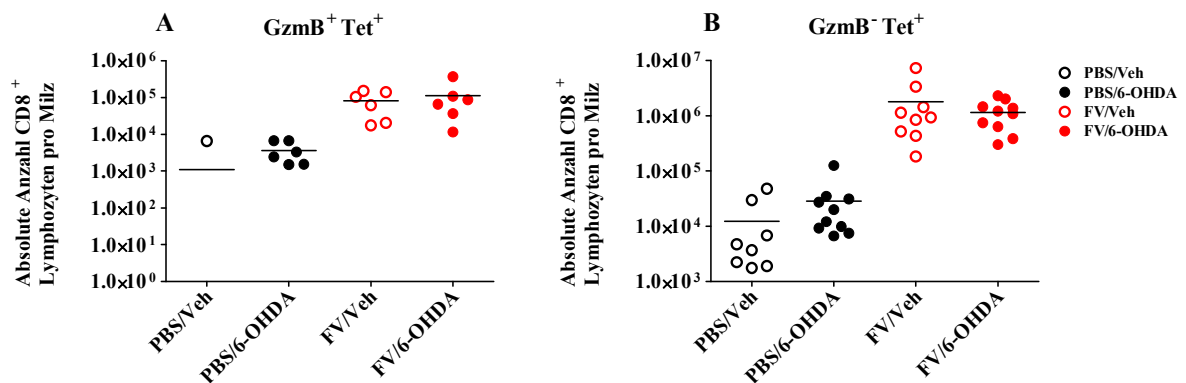


Abbildung 28: Auswirkung einer sympathischen Sympathektomie auf FV-induzierte Granzym B-Expression und Tetramer-Expression in CD8^+ T-Lymphozyten

Dargestellt sind die Mittelwerte der GzmB^- und Tet^+ -Expression in Milzleukozyten von FV-infizierten Mäusen (○; FV/VEH; $n = 9$), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (●; FV/6-OHDA; $n = 10$), nur mit PBS behandelten Mäusen (○; PBS/Veh; $n = 9$) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (●; PBS/6-OHDA; $n = 10$). Die Mittelwerte für jede Gruppe werden durch einen Querbalken dargestellt. Da bei einigen Proben nur in einem Teil ein Nachweis möglich war, bezieht sich der Mittelwert auf die separat angegebene Stichprobengröße. $\text{GzmB}^+ \text{Tet}^+$: PBS/Veh ($n = 1$); PBS/6-OHDA ($n = 6$); FV/Veh ($n = 6$); FV/6-OHDA ($n = 6$). $\text{GzmB}^- \text{Tet}^+$: PBS/Veh ($n = 8$).

3.5.6 Expansion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten sympathektomierten Mäusen

Die Auswirkung einer chemischen Sympathektomie während einer FV-Infektion auf die Expansion von regulatorischen T-Zellen wurde ebenfalls untersucht. Die $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Subpopulation kann anhand ihres Entstehungsortes in im Thymus gereifte natürliche regulatorische T-Zellen (nT_{reg}) und in der Peripherie induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{reg}) unterteilt werden. Eine Einteilung der beiden Populationen anhand von Oberflächenmarkern ist schwierig. Ein Klassifizierungsmarker ist beispielsweise die Expression des Transkriptionsfaktors Helios. Dieser wird nur von nT_{regs} exprimiert (Akimova *et al.*, 2011).

Die Analysen der T_{reg} (Abbildung 29 A), nT_{regs} (Abbildung 29 B) und iT_{regs} (Abbildung 29 C) zeigten weder einen Unterschied zwischen den FV-infizierten Mäusen (FV/Veh) gegenüber den Kontrollen (PBS/Veh), noch einen Unterschied nach einer Sympathektomie in den FV-infizierten Mäusen (FV/6-OHDA) gegenüber den anderen untersuchten Gruppen.

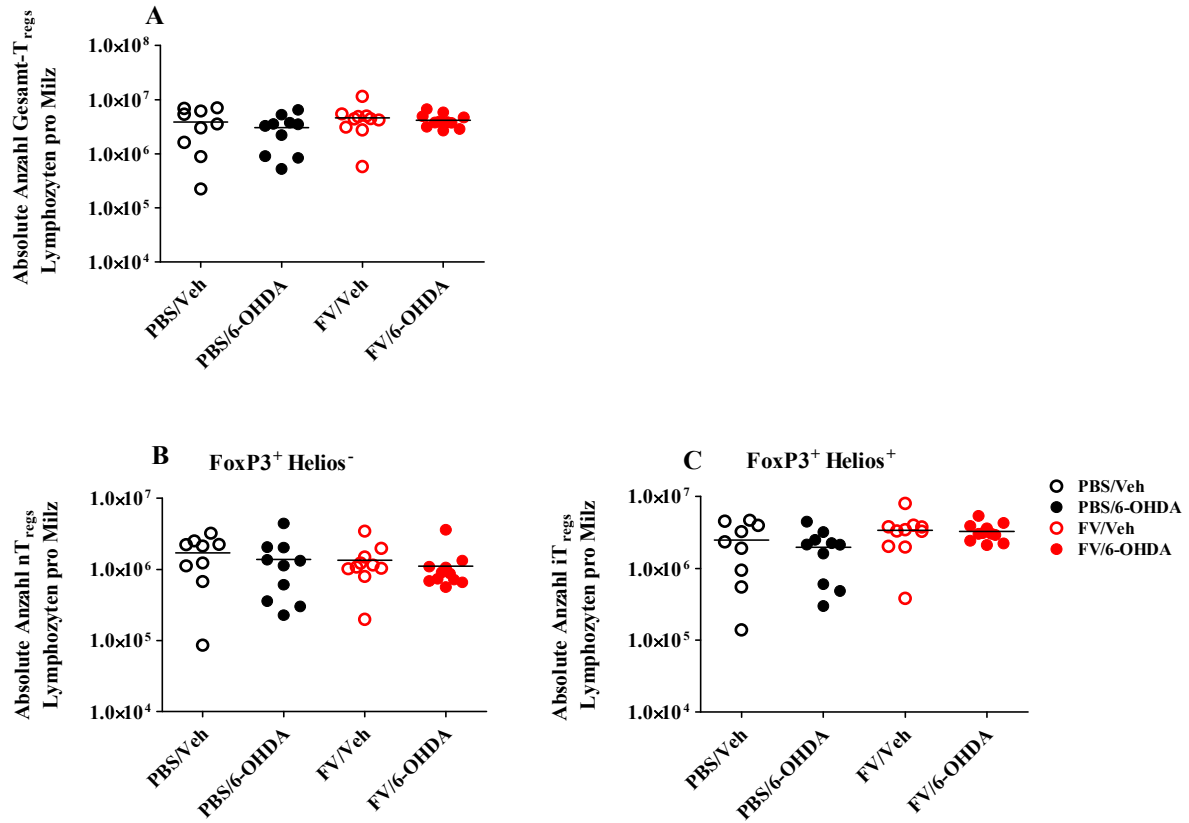


Abbildung 29: Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die Expansion von regulatorischen T-Zellen in FV-infizierten Mäusen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Expansion der T_{regs} in Milzleukozyten von FV-infizierten Mäusen (○; FV/VEH; n = 9), FV-infizierten sympathektomierten Mäusen (●; FV/6-OHDA; n = 10), nur mit PBS behandelten Mäusen (○; PBS/Veh; n = 9) und PBS behandelten sympathektomierten Mäusen (●; PBS/6-OHDA; n = 10). Die Mittelwerte für jede Gruppe werden durch einen Querbalken dargestellt.

3.5.7 Zusammenfassung der Einflussnahme einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion

Ziel der Untersuchung war es aufzuklären inwiefern das SNS einen Einfluss auf den Verlauf einer FV-Infektion sowie auf die FV-induzierte Enzymexpression hat. Durch die Methode der chemischen Sympathektomie sollten mittels 6-OHDA die peripheren noradrenergen Nervenendigungen zerstört werden.

Der Nachweis der Sympathektomie konnte durch die Bestimmung der NoradrenalinKonzentration mithilfe der HPLC erbracht werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die durch FV hervorgerufene Reduktion der NoradrenalinKonzentration durch eine Sympa-

thektomie in den FV-infizierten Mäusen verstärkt wurde. Es konnte weiter demonstriert werden, dass eine chemische Sympathektomie in FV-infizierten Mäusen zu einer Zunahme des Milzgewichtes sowie der Viruslast führte. Die FV-induzierte Expression der degradierenden Enzyme wurde durch eine chemische Sympathektomie in den infizierten Mäusen noch weiter verstärkt. Auf die Anzahl an zytokinproduzierenden T-Zellen hatte die Sympathektomie in den infizierten Mäusen nur einen tendenziell reduzierenden Einfluss, während die Expression von GzmB/Tet und die Expansion der T_{regs} nicht verändert wurden.

4 Diskussion

Das ZNS und das Immunsystem kommunizieren über reziproke Wege miteinander und können sich gegenseitig in ihrer Aktivität und Funktion modulieren. Ungeachtet des Umstandes, dass Zellen des Immunsystems als neue Quellen für neuroendokrine Mediatoren wie Katecholamine diskutiert werden, gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen zur Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsels in Immunzellen. Die vorliegende Arbeit befasst sich erstmals mit der Enzymexpression und dem Einfluss einer Zellaktivierung auf die Expression in murinen Milzleukozyten.

4.1 Konstitutive Expression der an der Synthese und Degradierung von Katecholaminen beteiligten Enzyme

Lange Zeit wurde angenommen, dass Katecholamine ausschließlich von neuronalen und neuroendokrinen Zellen synthetisiert, sezerniert und degradiert werden können. Erstaunlicherweise wurden jedoch auch in Immunzellen Katecholamine nachgewiesen (Bergquist *et al.*, 1994a; Bergquist *et al.*, 1994b; Knudsen *et al.*, 1996; Bergquist *et al.*, 1997; Cosentino *et al.*, 1999; Cosentino *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2003; Mignini *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2005; Flierl *et al.*, 2007). Die anfängliche Vermutung, dass Katecholamine nur passiv aus der Umgebung aufgenommen würden, wurde von Josefsson *et al.* (1996), Cosentino *et al.* (2000) und Jiang *et al.* (2006) widerlegt. Die Ergebnisse jüngerer Studien deuten darauf hin, dass Immunzellen selbst Katecholamine synthetisieren, freisetzen und degradieren (Qiu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Flierl *et al.*, 2009). Es wird deshalb angenommen, dass von Immunzellen produzierte endogene Katecholamine eine wichtige Rolle bei der autokrinen/parakrinen Regulation der Zellfunktion während der Immunantwort spielen (Spengler *et al.*, 1994; Freeman *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2011).

Enzymexpression in Milzleukozyten

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der konstitutiven Expression aller Schlüsselenzyme für die Synthese (TH, DBH und PNMT) und Degradierung (COMT, MAO-A) von Katecholaminen in Milzleukozyten. Bisher waren nur einzelne Enzyme jeweils in verschiedenen Geweben untersucht worden (Andreassi *et al.*, 1998), nie die Gesamtheit aller Enzyme in einem bestimmten Zelltypus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegten eindeutig, dass sowohl die Enzyme für die Synthese als auch für die Degradierung von Katecholaminen konstitutiv in den Milzleukozyten exprimiert

werden (Abbildung 8). Um die korrekte Funktion der qPCR zu belegen und eine Amplifikation des richtigen Gensegments nachzuweisen, wurden die qPCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf Basis der Sequenzen berechneten Fragmentlängen bestätigte sich, dass die richtigen Gensegmente amplifiziert wurden.

Die Daten lassen vermuten, dass Milzleukozyten sowohl an der *de novo* Synthese als auch am Abbau von Katecholaminen beteiligt sein könnten und sie daher neben den neuronalen und neuroendokrinen Zellen eine bisher unbekannte Quelle für Katecholamine darstellen.

Diese Ergebnisse zur Enzymexpression stehen im Einklang mit Studien, die das Vorhandensein der genannten Enzyme in Immunzellen belegten. So wiesen Cosentino *et al.* (2002b) und Qiu *et al.* (2004) die Expression von TH in Lymphozyten und PBMCs nach. In Lymphozyten wiesen Giubilei *et al.* (2004) die Expression von DHB nach, Bidart *et al.* (1983) die Expression von COMT und Balsa *et al.* (1989) diejenige von MAO-A. In Milz und Thymus wird PNMT exprimiert (Andreassi *et al.*, 1998).

Anders als in den hier zitierten Studien, deren Ergebnisse zum Teil aus Stimulationsversuchen stammten, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals die konstitutive Expression untersucht und darüber hinaus auch erstmals alle Enzyme in einem Zelltyp belegt.

Die untersuchten Enzyme unterschieden sich in ihren Expressionsstärken. Das degradierende Enzym COMT wies eine stärkere Expression auf als alle synthetisierenden Enzyme. Die Enzymexpression dieser Enzyme wurde bislang nie vergleichend untersucht, daher ist ein Vergleich mit Daten in der Literatur nicht möglich. Die stärkere COMT-Expression könnte ein Indiz dafür sein, dass Milzleukozyten stärker an der Degradierung von Katecholaminen beteiligt sind als an der Synthese. Die Expressionsunterschiede zwischen den synthetisierenden und degradierenden Enzyme könnten auch im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des homöostatischen Gleichgewichtes bezüglich der Katecholamine stehen, denn es ist bekannt, dass eine geringe Konzentration an Katecholaminen die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen positiv beeinflusst, während hohe Konzentrationen die Zellapoptose induzieren kann (Josefsson *et al.*, 1996; Bergquist *et al.*, 1997).

Die Expression von COMT war stärker als die von MAO-A. Daher könnte man vermuten, dass COMT den Hauptabbauweg in den Milzleukozyten darstellt. Dazu sind bislang allerdings keine Untersuchungen bekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich die beiden Abbauwege hinsichtlich des Ortes der Freisetzung von Katecholaminen unterscheiden (Kvetansky *et al.*, 2009). So werden neuronale Katecholamine über den ersten Abbauweg, auch als Uptake 1 bekannt, durch MAO degradiert. Beim zweiten Abbauweg (Uptake 2) werden extraneuronale Katecholamine über COMT abgebaut (Kvetansky *et al.*, 2009). Vor diesem Hin-

tergrund könnte man annehmen, dass in den Milzleukozyten extraneuronale Katecholamine über COMT abgebaut werden.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten die Befunde von Jiang *et al.* (2006). Sie beschreiben, dass beim Abbau von Katecholaminen über MAO Sauerstoffradikale und oxidative Metaboliten entstehen. Diese Radikale bewirken eine Apoptose der Zellen. Ein hauptsächlicher Abbau der Katecholamine über COMT würde die Entstehung der Sauerstoffradikale und damit eine Apoptose verhindern.

Enzymexpression in verschiedenen Leukozytensubpopulationen

Nachdem mit dieser Arbeit zunächst die konstitutive mRNA-Enzymexpression nachgewiesen werden konnte, sollte anschließend geklärt werden, ob die Expression der Synthese- und Abbauenzyme Unterschiede zwischen den verschiedenen Leukozytensubpopulationen aufweist. Dazu wurden sieben verschiedene Subpopulationen aus den Milzleukozyten (CD11b⁺-myeloide Zellen, CD19⁺ B-Zellen, CD8⁺ CTL, CD4⁺ T-Helferzellen, CD90.2⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺ T_{regs} und CD4⁺CD25⁻ T_{eff}) isoliert und untersucht (Abbildung 10). Die TH-Expression ist in Leukozytensubpopulationen sehr heterogen. Die stärkste Expression wurde in den CD11b⁺-myeloiden Zellen ($0,20 \pm 0,02$ fg/ μ g Gesamt-RNA) und die niedrigste Expression in T_{eff} Zellen ($0,01$ fg/ μ g Gesamt-RNA) nachgewiesen.

Die höchste COMT-Expression ($39,12 \pm 5,20$ fg/ μ g Gesamt-RNA) trat ebenfalls in CD11b⁺-myeloiden Zellen auf und die niedrigste in T_{regs} ($11,20 \pm 0,08$ fg/ μ g Gesamt-RNA). Bidart *et al.* (1983) untersuchten als einzige Unterschiede von COMT in verschiedenen Subpopulationen. So beschrieben Bidart *et al.* (1983) eine höhere COMT-Aktivität in B-Zellen als in T-Zellen, was sich mit den Expressionsergebnissen dieser Arbeit deckte.

Die höchste MAO-A-Expression lag in den CD8⁺ T-Zellen vor ($2,02 \pm 0,19$ fg/ μ g Gesamt-RNA) und die niedrigste Expression in den T_{eff} ($1,03 \pm 0,08$ fg/ μ g Gesamt-RNA). Vergleichbare publizierte Daten für die hier untersuchten Subpopulationen liegen nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die myeloiden Zellen sowohl die höchste TH- als auch die höchste COMT-Expression aufwiesen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass diese Subpopulation sowohl in Synthese als auch Degradierung eine wesentliche Rolle spielt. Weiterführende Experimente wären notwendig, um die Rolle dieser Population in der bidirektionalen Kommunikation und dem Katecholaminmetabolismus weiter aufzuklären.

Vergleich der Enzymexpression in Geweben und Milzleukozyten

Die bekannten klassischen Orte für die Synthese von Katecholaminen sind der Hirnstamm und die Nebenniere. Nachdem diese Arbeit die konstitutive Expression der entsprechenden Enzyme jedoch auch in Milzleukozyten nachgewiesen hatte, sollte die Expression in diesen drei Geweben miteinander verglichen werden, um eventuell Hinweise auf die physiologische Relevanz dieser Enzyme in Milzleukozyten zu erhalten. Vergleiche für diese drei Gewebe, die innerhalb ein und desselben Modellsystems durchgeführt wurden, gibt es bisher nicht.

Alle synthetisierenden Enzyme hatten ihre höchste Expression in der Nebenniere und die niedrigste in den Milzleukozyten (siehe Abbildung 11). Die Expression der degradierenden Enzyme in den beiden Geweben unterschied sich nicht voneinander, sie war aber höher als die Expression in den Milzleukozyten. Die Expression der degradierenden Enzyme war insgesamt stärker als die der synthetisierenden Enzyme. Auch die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Geweben und den Milzleukozyten waren innerhalb der Gruppe der degradierenden Enzyme geringer. Auch dies könnte ein weiterer Hinweis für eine Rolle der Milzleukozyten vor allem in der Degradierung von Katecholaminen sein. Für valide Aussagen über die physiologische Relevanz wären weitere Experimente notwendig. Da es sich bei diesen Daten um mRNA-Befunde handelt, können posttranslationale Modifikationen nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Auswirkung einer Zellaktivierung auf die Enzymexpression

Außer der Expression in verschiedenen Geweben und Leukozytensubpopulationen wurden die Auswirkungen einer Zellaktivierung auf die Enzymexpression untersucht. Bislang ist über die Auswirkungen einer Immunaktivierung auf die Enzymexpression in Immunzellen nur wenig bekannt (Flierl *et al.*, 2007; Flierl *et al.*, 2008).

Enzymexpressionskinetik in Milzleukozyten

Die Effekte der Zellaktivierung auf die Enzymexpression wurden spezifisch an einer T- und einer B-Zellaktivierung mit den entsprechenden Antikörpern untersucht (siehe Abbildung 12). Nach der Inkulturnahme der Milzleukozyten konnte weder in den stimulierten noch in den nicht stimulierten Kontrollen eine Expression der synthetisierenden Enzyme TH und DBH nachgewiesen werden; lediglich PNMT wurde detektiert. Dieser Befund überraschte, weil der Nachweis der konstitutiven Expression *in vitro* sowohl in dieser Arbeit als auch vielen anderen Stimulationsstudien gelungen war (Cosentino *et al.*, 2002a; Qiu *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2005; Flierl *et al.*, 2007). Ein experimenteller Fehler kann an dieser Stelle ausgeschlossen

werden, da auch bei wiederholter Durchführung kein Nachweis möglich war. Über die möglichen Ursachen kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Eine verminderte mRNA-Stabilität könnte die fehlende Enzymexpression erklären. Eine Korrelation zwischen einer verminderten mRNA-Stabilität und einer erhöhten intrinsischen Aktivität der TH wird kontrovers diskutiert (Cosentino *et al.*, 2002b). Kumer *et al.* (1996) vermuteten, dass eine cAMP-abhängige Proteinphosphorylierung für eine mangelhafte mRNA-Stabilität verantwortlich ist (Kumer *et al.*, 1996). Eine verminderte Stabilität der mRNA von DBH wurde bisher nicht beschrieben, kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der fehlenden Expression der synthetisierenden Enzyme wurde der weitere experimentelle Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses der Zellaktivierung auf die Expression der abbauenden Enzyme COMT und MAO-A gelegt.

Sowohl nach einer T- als auch B-Zellaktivierung war ein transienter Anstieg der COMT-Expression zu verzeichnen, wobei die T-Zellaktivierung zu einem starken Anstieg führte. Dieser Befund steht im Gegensatz zu Daten von Flierl *et al.* (2007), die eine Abnahme der COMT-Expression nach Stimulation nachwiesen. Allerdings hatten Flierl *et al.* (2007) Makrophagen und neutrophile Zellen der Ratte mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert; dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Auch bei MAO-A führte die Zellaktivierung zu einem transienten Expressionsanstieg, der für B- und T-Zellaktivierung gleich groß war, aber bei einer B-Zellaktivierung früher einsetzte. Der Befund eines Expressionsanstiegs deckt sich mit den Ergebnissen von Flierl *et al.* (2007).

Die absolute Stärke der Expression war für COMT größer als für MAO-A und entspricht damit dem Befund der Analyse der konstitutiven Expression. Auch dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Milzleukozyten eine Rolle in der Degradierung von Katecholaminen spielen und der Hauptabbauweg in diesen Zellen über COMT verläuft. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste die Katecholaminkonzentration in den Zellen gemessen werden.

Enzymexpressionskinetik in murinen T- und B-Lymphozyten

Um die Daten der Zellaktivierung zu validieren und sicherzustellen, dass es sich um einen direkten T- bzw. B-Zelleffekt handelte, wurde der Einfluss dieser Zellaktivierung auch auf isolierte Lymphozyten untersucht (Abbildung 13 und 14).

In isolierten B-Lymphozyten schwankte die COMT-Expression sehr stark, so dass ein Anstieg der Expression nur vermutet werden konnte. Dasselbe gilt für die Expression von MAO-A. Es ist daher zu vermuten, dass die Effekte der B-Zellaktivierung in Leukozyten durch indirekte

Effekte anderer Zellen zustande kamen. Madden *et al.* (1995) vermuteten, dass katecholaminerge Effekte auf B-Zellen durch eine veränderte Zytokinproduktion von T-Zellen und Makrophagen hervorgerufen werden.

Für die T-Zellaktivierung ergab sich ein anderes Bild. Hier führte eine Stimulation der T-Zellen ebenfalls zu einem transienten Anstieg der COMT- und MAO-A-Expression. Dieser Befund bestätigte somit die Daten der T-Zellaktivierung in Milzleukozyten und es kann ein direkter T-Zelleffekt angenommen werden. Ob es tatsächlich einen Zusammenhang zwischen der Enzymexpression und dem TCR-Signalweg in Immunzellen der Milz gibt, müsste durch weiterführende Experimente untersucht werden.

Auswirkung einer T-Zellaktivierung auf die intrazelluläre Noradrenalkonzentration

Weil der Expressionsanstieg bei den degradierenden Enzymen die Vermutung nahelegte, dass Milzleukozyten am Abbau von Katecholaminen beteiligt sein könnten, wurde die intrazelluläre Noradrenalkonzentration in den Milzleukozyten nach einer T-Zellaktivierung untersucht (siehe Abbildung 15). Es wurde im Vorfeld aufgrund der bisherigen Daten dieser Arbeit vermutet, dass die Noradrenalkonzentration durch eine Stimulation der Milzleukozyten reduziert wird. Die Befunde der Arbeit zeigten, dass die intrazelluläre Noradrenalkonzentration im Verlauf einer T-Zellaktivierung reduziert wird. Um die Rolle der Milzleukozyten bei der Degradierung von Katecholaminen näher zu untersuchen, wäre es sinnvoll, beispielsweise die Metaboliten des Noradrenalins nach einer Stimulation zu betrachten. Wäre die Annahme richtig, müsste die Konzentration der Metaboliten ansteigen. Allerdings ist damit noch nicht ausgeschlossen, dass der Effekt auf die Konzentration des Noradrenalins über andere Signalwege vermittelt wird.

Auswirkung einer Calcineurininhibition auf die Enzymexpression

Die Ergebnisse der T-Zellaktivierung in der vorliegenden Arbeit lieferten zum ersten Mal einen Hinweis dafür, dass die Enzymexpression im Zusammenhang mit dem T-Zellrezeptor (TCR)-Signalweg stehen könnte. Bislang ist jedoch unklar, welcher Mechanismus für den Effekt einer T-Zellaktivierung auf die Enzymexpression verantwortlich sein könnte. Um Hinweise auf mögliche Mechanismen zu bekommen, wurden die Milzleukozyten mit anti-CD3 mAK stimuliert. Durch eine Aktivierung des TCRs steigt der intrazelluläre Calciumspiegel innerhalb der Zellen an, wodurch im nachfolgenden Schritt die Ca^{2+} -abhängige Proteinphosphatase Calcineurin (CaN) aktiviert wird (Clipstone *et al.*, 1994; Crabtree *et al.*, 1994). Calcineurin ist eine Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase, die die zytosolische

Untereinheit des Transkriptionsfaktors „*Nuclear factor of activated T-cells*“ (NFAT) dephosphoryliert (Clipstone *et al.*, 1994; Crabtree *et al.*, 1994). Der Transkriptionsfaktor transloziert daraufhin in den Zellkern und induziert dort die Transkription diverser Gene wie beispielsweise IL-2 oder IFN- γ (Rao *et al.*, 1995; Feske *et al.*, 2003; Krauss *et al.*, 2008). Durch diesen Signalweg kommt es zu einer Verstärkung der Immunantwort von aktivierten T-Lymphozyten. Inkubiert man die T-zellaktivierten Milzleukozyten gleichzeitig noch mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA), bindet dieses an das Immunophilin Cyclophilin A, woraufhin dieser Komplex an CaN bindet und ihn selektiv inhibiert. Durch diese Inhibition wird die Bindung von CaN an NFAT blockiert und infolgedessen kommt es zu keiner Transkription und Ausschüttung der oben genannten Zytokine (Ho *et al.*, 1996).

Die qPCR-Ergebnisse dieser Arbeit belegten, dass eine Calcineurininhibition durch CsA zu einer konzentrationsabhängigen Suppression der COMT- und MAO-A-Expression führte (siehe Abbildung 16). Vergleichbare Versuche wurden bisher für keines der Enzyme publiziert. Die eventuelle Verbindung zwischen der COMT-Expression und dem TCR Signalweg könnte allerdings nicht nur über NFAT erklärt werden, sondern auch über andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NF- κ B. Es ist bekannt, dass Calcineurin die TCR-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch die Kontrolle eines Proteinkomplexes aus Carma 1, Bcl 10 und Malt 1 (CBM) reguliert. Eine Inhibition der calciumabhängigen Proteinphosphatase reduziert die NF- κ B Aktivität sowie die Ausbildung des CBM-Komplex (Palkowitsch *et al.*, 2011). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde bereits von Tchivileva *et al.* (2009) als Inhibitor der COMT-Expression identifiziert.

Für die MAO-A-Expression könnte zum einen angenommen werden, dass die T-Zellaktivierung und die Expression von COMT und MAO-A über zwei verschiedene Mechanismen in Zusammenhang stehen. Zum anderen könnte aber auch derselbe Mechanismus für beide Enzyme in Betracht gezogen werden. So könnte auch ein Zusammenhang der Suppression der Expression der beiden Enzyme und der Inhibition der Freisetzung der Zytokine bestehen. Um der Vermutung einer möglichen Verbindung zwischen den Zytokinen und der Enzymexpression nachzugehen, wären weitere Experimente notwendig. So könnte in Stimulationsexperimenten rekombinantes IL-2 oder IFN- γ eingesetzt werden und so die Auswirkungen der Zytokine auf die Expression von COMT und MAO-A untersucht werden.

Enzymexpression in humanen T-Lymphozyten

Um auszuschließen, dass es sich bei allen Befunden nur um einen Effekt in der Maus handelte bzw. auch zur Überprüfung einer möglichen Relevanz für den Menschen, ist es sehr wichtig,

diese Experimente auch an humanen Zellen durchzuführen. Eine Übertragung von Ergebnissen von der Maus auf den Menschen und *vice versa* ist nicht unproblematisch, da die Herkunft der Zellen ausschlaggebend für die Ergebnisse sein können (Sanders *et al.*, 2002). Daher wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob die Enzyme für die Degradierung von Katecholaminen in humanen T-Lymphozyten exprimiert werden und wie sich eine T-Zellaktivierung auswirkt (siehe Abbildung 17).

Sowohl COMT als auch MAO-A wurden in humanen T-Lymphozyten exprimiert. Die T-Zellaktivierung führte bei beiden Enzymen zu einem Anstieg der Expression, der bei COMT stärker war als bei MAO-A.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden in murinen Lymphozyten, sodass von einem artunabhängigen Effekt ausgegangen werden kann.

4.3 Untersuchungen zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufes einer FV-Infektion

Die physiologische Relevanz der *in vitro* beobachteten Phänomene und die Interaktion zwischen ZNS und Immunsystem wurden zum besseren Verständnis auch anhand von *in-vivo*-Studien näher untersucht.

Es wird angenommen, dass eine bidirektionale Kommunikation der beiden Systeme eine protektive Rolle bei Krankheitsverläufen spielen könnte, während das Fehlen oder die Insuffizienz dieser Interaktion den Krankheitsverlauf deutlich verschlechtern kann (Straub *et al.*, 2007). Für die *in-vivo*-Untersuchungen wurde ein Retrovirales Infektionsmodell der Maus, das Friend Virus (FV), verwendet. Ziel dieses Versuchsteils war es, zunächst den optimalen Zeitpunkt für die Untersuchungen zu ermitteln. Daher wurde eine Zeitreihe durchgeführt und die Mäuse zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion getötet und die Milz für weitere Analysen entnommen. Darauf aufbauend sollte auch der Einfluss einer FV-Infektion auf die Enzymexpression und NoradrenalinKonzentration untersucht werden.

Charakterisierung des Verlaufes einer FV-Infektion anhand des Milzgewichtes

Eine Infektion mit FV resultiert in einer polyklonalen Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen, die symptomatisch durch eine Splenomegalie gekennzeichnet ist (Dittmer *et al.*, 2002). Daher ist das Milzgewicht ein wichtiger Indikator, um den Verlauf einer FV-Infektion zu charakterisieren. Im Vergleich zu den Kontrollen wurde das höchste Milzgewicht in den FV-infizierten Mäusen zehn Tage nach Infektion erreicht (siehe Abbildung 20). Dieser Befund deckt sich mit publizierten Daten des FV-Infektionsmodells, die bereits anhand der CTL-Aktivierung und der Produktion von zytotoxischen Molekülen zeigen konnten, dass Tag

zehn nach Infektion der optimale Untersuchungszeitpunkt ist (Hasenkrug *et al.*, 2007; Zelinskyy *et al.*, 2009; Nair *et al.*, 2011).

Enzymexpression im Verlauf einer FV-Infektion

Zusätzlich wurden die Auswirkungen einer Infektion auf die Expression der Enzyme des Katecholaminstoffwechsel analysiert, weil es dazu bis zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine Studien gab. Die Expression der synthetisierenden Enzyme TH, DBH und PNMT schwankte sehr stark. Es scheint einen Trend zur Abnahme der Expression in den FV-infizierten Mäusen zu geben (siehe Abbildung 21). Um fundierte Aussagen machen zu können, müsste das Experiment jedoch mit einer größeren Anzahl Stichprobe wiederholt werden. Die FV-Infektion induzierte die höchste Expression der degradierenden Enzyme jeweils an Tag zehn. Somit deckt sich dieser Befund zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes mit den Ergebnissen des Milzgewichtes und es kann festgehalten werden, dass zehn Tage nach Infektion der optimale Untersuchungszeitpunkt ist.

Die Expression von COMT war höher als die von MAO-A. Somit stützen auch diese *in vivo* erhobenen Befunde die anhand von *in-vitro*-Daten aufgestellte Hypothese, dass Milzleukozyten an der Degradierung von Katecholaminen beteiligt sein könnten und der Hauptabbauweg über COMT verläuft.

NoradrenalinKonzentration im Verlauf einer FV-Infektion

Der Einfluss der FV-Infektion auf die NoradrenalinKonzentration der Milz wurde untersucht. Die Konzentration sank im Verlauf der FV-Infektion und die stärkste Reduktion trat am Tag zehn nach der Infektion auf (siehe Abbildung 22). Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Studien (del Rey *et al.*, 2003; del Rey *et al.*, 2006). Roggero *et al.* (2012) beobachteten eine Reduktion der NoradrenalinKonzentration der Milz infolge einer Infektion mit *Trypanosoma cruzi*. Allerdings nahmen die Autoren an, dass die Reduktion des Noradrenalins durch eine anhaltende Immunaktivierung zustande käme.

Dieser Effekt einer anhaltenden Immunaktivierung aufgrund des Verlustes der noradrenergen Nervenfasern wurde bereits bei *lpr/lpr* Mäusen sowie in arthritischen Gelenken und der experimentell induzierten allergischen Encephalomyelitis der Ratte beobachtet (del Rey *et al.*, 2003; del Rey *et al.*, 2006; Schauenstein *et al.*, 2006; del Rey *et al.*, 2008). Daher müsste auch für diese Arbeit die Reduktion der NoradrenalinKonzentration durch einen Verlust der Nervenfasern in Folge einer anhaltenden Immunaktivierung in Betracht gezogen werden.

4.4 Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion

Die Einflussnahme des SNS auf die Immunantwort während verschiedener Erkrankungen wurde bereits belegt (Templeton *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2002). Eine Methode, den Einfluss des SNS auf das Immunsystem zu untersuchen, ist die chemische Sympathektomie mithilfe des Neurotoxins 6-OHDA. Sie wurde in dieser Arbeit angewandt, um den Einfluss des SNS auf den Verlauf einer FV-Infektion und die Enzymexpression zu ermitteln. Eine erfolgreiche Zerstörung der katecholaminergen Nervenfasern durch die Applikation von 6-OHDA wurde indirekt über die Bestimmung der NoradrenalinKonzentration nachgewiesen. In den dazu durchgeführten Versuchen (siehe Abbildung 24) sank die NoradrenalinKonzentration. Daraus lässt sich schließen, dass das in der Milz gemessene Noradrenalin neuronalen Ursprungs ist. Dies bestätigt die älteren Befunde von Madden *et al.* (1995). Des Weiteren lieferten die Ergebnisse zum ersten Mal einen Beleg dafür, dass durch eine FV-Infektion in sympathektomierten Mäusen die Konzentration des Noradrenalins noch weiter reduziert wird als die Reduktion der NoradrenalinKonzentration in den FV-infizierten Mäusen, die nicht mit 6-OHDA behandelt wurden. Vergleichbare Studien sind derzeit nicht bekannt.

Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf das Milzgewicht und die Viruslast

Das Milzgewicht und die Viruslast sind zwei Indikatoren, um die Auswirkung einer chemischen Sympathektomie auf eine FV-Infektion beurteilen zu können.

Die Versuche zeigten, dass das Milzgewicht durch eine chemische Sympathektomie in den FV-infizierten Mäusen steigt (siehe Abbildung 25). Es ist daher anzunehmen, dass die polyklonale Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen durch den Verlust der katecholaminergen Nervenfasern begünstigt wird. Im Umkehrschluss könnte man annehmen, dass Noradrenalin eventuell einen regulatorischen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat, doch wären dazu weitere Untersuchungen notwendig um dies zu belegen.

Nach einer Sympathektomie nahm die Viruslast in den infizierten Mäusen noch weiter zu; diese Zunahme korrelierte mit dem Milzgewicht. Es ist daher anzunehmen, dass die Virusreplikation durch das Fehlen der katecholaminergen Nervenfasern begünstigt wird und somit auch die polyklonale Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen ansteigt.

Auch Templeton *et al.* (2008) beobachteten, dass das Fehlen der katecholaminergen Innervation zu einer erhöhten Viruslast führte. Somit könnte vermutet werden, dass das SNS und seine neuroendokrinen Mediatoren eine antiinflammatorische Rolle in der FV-Infektion innehaben. In der Literatur wird eine mögliche pro- als auch eine antiinflammatorische Rolle des SNS in verschiedenen Erkrankungen kontrovers diskutiert (Hall *et al.*, 1982; Livnat *et al.*,

1985; Callahan *et al.*, 2002; Pal *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2002; Härle *et al.*, 2005; Grebe *et al.*, 2009). Weil den Studien unterschiedliche experimentelle Systeme und Erkrankungen zugrunde lagen, erlauben sie keine generalisierten Aussagen über den Einfluss des SNS auf das Immunsystem.

Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Enzymexpression

Die vorliegende Arbeit untersuchte zum ersten Mal den Einfluss einer chemischen Sympathektomie auf die FV-induzierte Enzymexpression des Katecholaminstoffwechsels. Die durchgeführten Expressionsanalysen (siehe Abbildung 26) zeigten eine Abnahme der TH- und DBH-Expression in FV-infizierten Mäusen und eine Zunahme in den zusätzlich chemisch sympathektomierten Mäusen. Man könnte vermuten, dass es durch den Verlust der katecholaminergen Nervenfasern und durch die Depletion des Noradrenalins zu einer Verschiebung des homöostatischen Gleichgewichtes kommt und die Regulation des Immunsystems durch das SNS fehlt. Um dies zu kompensieren, könnten die Immunzellen selbst die adrenergen Agonisten synthetisieren und versuchen, die Regulation aufrecht zu erhalten. Sowohl in älteren (Spengler *et al.*, 1994) als auch in jüngeren Studien (Freeman *et al.*, 2001) wurde vermutet, dass Katecholamine, die von den Immunzellen selbst sezerniert werden, autokrine/parakrine Effekte auf Regulationen von Immunzellen und ihre Funktion haben.

Auch in diesen Versuchen zeigte sich erneut, dass die degradierenden Enzyme immer höher exprimiert wurden als die synthetisierenden Enzyme und dass die Expression von COMT stärker war als die von MAO-A.

Einfluss auf zytokinproduzierenden T-Lymphozyten

Um den Einfluss des SNS auf die Immunantwort noch besser zu verstehen, wurde auch der Einfluss auf IL-2-, IFN- γ - und TNF- α -produzierende T-Helferzellen und CTL untersucht (siehe Abbildung 27). Die Ergebnisse zeigten für alle drei Zytokine in beiden T-Zellpopulationen in den FV-infizierten sympathektomierten Mäusen eine tendenzielle Abnahme. Für die IFN- γ -produzierenden T-Zellen stehen die Ergebnisse in Einklang mit den Ergebnissen von Templeton *et al.* (2008), die allerdings im *Ganglion trigeminale* erhoben wurden, einem durch eine okulare HSV-1 Infektion beeinflussten Ganglion. Allerdings stehen die Daten gleichzeitig im Widerspruch zu den Ergebnissen von Grebe *et al.* (2009), die ebenfalls die IFN- γ -Produktion in T-Zellen untersuchten und eine Zunahme der IFN- γ -Produktion beobachteten. Eventuell sind diese Differenzen durch die unterschiedlichen verwendeten In-

fektionsmodelle zu erklären; hier wurde das FV verwendet, während Grebe *et al.* das Influenza A Virus verwendet haben. Aber auch die Durchführung in der Sympathektomie unterschied sich. In dieser Arbeit wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen 150 mg/kg 6-OHDA appliziert und nach einem Tag Pause die Infektion vorgenommen, Gebe und Kollegen appliziert dreimal jeweils 100 µg/kg 6-OHDA über eine Woche verteilt und infizierten die Tiere drei Tage nach der letzten Applikation.

Die Befunde der TNF- α -produzierenden T-Zellen stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Grebe *et al.* (2009), die keine Veränderung der TNF- α -Produktion zeigten. Allerdings könnten, wie bereits zuvor für IFN- γ erwähnt, auch hier die Differenzen durch unterschiedliche Methoden zustande gekommen sein.

Einfluss auf die Effektorfunktion von T-Zellen

Eine wichtige Funktion der CD8⁺ T-Lymphozyten ist die Eliminierung von virusinfizierten Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Molekülen wie z. B. Granzym B (Kam *et al.*, 2000). Darüber hinaus können CTL nach einer viralen Infektion expandieren. Der Einfluss des SNS auf die Expression von GzmB und die Expansion der FV-spezifischen T-Zellen wurden ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 28). Die durchflusszytometrischen Analysen der GzmB-Expression belegten lediglich die erwarteten Unterschiede zwischen FV-infizierten Mäusen und den Kontrollen. Die chemische Sympathektomie der infizierten Tiere führte hingegen zu keiner Veränderung im Vergleich zur ebenfalls infizierten Experimentalgruppe. Daher ist anzunehmen, dass das SNS keinen Einfluss auf die Granzym B-Freisetzung hat. Templeton *et al.* (2008) beobachteten dasselbe bei einer HSV-1-Infektion, die ebenfalls keine Unterschiede in der Granzym B-Expression zur Folge hatte

Eine Expansion der FV-spezifischen CTL wurde ebenfalls nur im Rahmen der Infektion beobachtet, während eine chemische Sympathektomie in den FV-infizierten Tieren zu keiner weiteren Veränderung gegenüber den infizierten nicht sympathektomierten Tieren führte. Eine Expansion von virusspezifischen CTLs wurde bislang nicht untersucht.

Expansion von T_{regs}

Seit langem wird eine Einflussnahme des SNS auf die regulatorischen T-Zellen vermutet (Bhowmick *et al.*, 2009). Daher wurde für diese Arbeit auch ein Experiment zum Einfluss des SNS auf die Expansion der T_{regs} während einer FV-Infektion durchgeführt (siehe Abbildung 29). Die alleinige FV-Infektion führte zu keiner Expansion der verschiedenen T_{regs}. Auch bei gleichzeitig fehlender katecholaminerger Innervation gab es keine Veränderungen.

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bhowmick *et al.* (2009), die eine Expansion der T_{regs} beobachten konnten. Allerdings wurden die Untersuchungen an gesunden sympathektomierten Mäusen durchgeführt. Doch auch in den beiden Kontrollgruppen dieser Arbeit trat der von Bhowmick *et al.* beobachtete Effekt nicht auf. Die Experimente dieser Arbeit wurden an männlichen Mäusen durchgeführt, während Bhowmick *et al.* (2009) weibliche Mäuse verwendet haben. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Differenzen in den Befunden eventuell auf die Unterschiede im Geschlecht der Mäuse und der damit verbundenen hormonellen Unterschiede zurückzuführen sind. Trotz der fehlenden Expansion sollte ein Effekt des SNS auf die Funktion der T_{regs} (welcher in dieser Arbeit nicht untersucht wurde) nicht ausgeschlossen werden. Denn bisherige Studien demonstrieren, dass die Funktion von regulatorischen T-Zellen durch den Transmitter des SNS beeinflusst wird (Cosentino *et al.*, 2007). Des Weiteren ist zu bedenken, dass T_{regs} vor allem in der chronischen Phase der FV-Infektion eine wichtige Rolle spielen. Daher sollte in weiteren Experimenten auch der Einfluss des SNS auf die T_{regs} in einer chronischen Phase der FV-Infektion analysiert werden.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit war, die erstmalige Demonstration der konstitutiven Expression von Enzymen des Katecholaminstoffwechsels in Milzleukozyten und deren Subpopulationen. Ein weiteres wichtiges Resultat dieser Arbeit war der Beweis dafür, dass die Expression der degradierenden Enzyme durch eine T-Zellaktivierung beeinflusst wird und es einen Zusammenhang zwischen der Enzymexpression und dem TCR-Signalweg gibt. Darüber hinaus wurde ebenfalls gezeigt, dass die Enzymexpression auch durch eine Infektion mit FV beeinflusst werden kann.

Es wäre wünschenswert, in zukünftigen Experimenten zum einen die Anzahl der Stichproben beider Experimente zu erhöhen, um so auch statistisch valide Aussagen treffen zu können. Zum anderen könnte versucht werden, die Enzymexpression auch auf Proteinebene zu untersuchen, um so die bisherigen Daten zu untermauern.

Weiter könnte noch die hier aufgestellte Hypothese der Beteiligung der Milzleukozyten an der Degradierung von Katecholaminen über den COMT-Abbaupfad weiter überprüft werden, indem beispielsweise COMT-Inhibitoren verwendet werden.

Basierend auf den Ergebnissen der *in-vivo*-Versuche könnte die eventuelle Beteiligung der Adrenorezeptoren an der neuroimmunologischen Modulation im Verlauf einer FV-Infektion weiter untersucht werden. Dazu könnten durch die Behandlung mit Agonisten und Antagonisten des Noradrenalins Vergleiche zur chemischen Sympathektomie gezogen werden, um so

Rückschlüsse auf dessen Wirkungsmechanismus zu erhalten. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des SNS auf den Verlauf einer akuten FV-Infektion untersucht; für zukünftige Experimente wäre es aber auch interessant zu sehen, welchen Einfluss das SNS auf den chronischen Verlauf einer FV-Infektion hat. Auch Effekte von 6-OHDA auf andere physiologische Parameter wie z.B. Wachstumsfaktoren der Nerven und Thymosin, die wiederum einen Effekt auf den Verlauf einer Immunantwort während einer FV-Infektion haben, könnten zukünftig untersucht werden.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Erstmals wurde in dieser Arbeit die konstitutive Expression der katecholaminsynthetisierenden und degradierenden Enzyme gezeigt und die Expression miteinander verglichen. Die Expressionsvergleiche der Enzyme in den Leukozyten und ihren Subpopulationen lassen aufgrund der höheren Expression der degradierenden Enzyme auf eine Beteiligung der Milzleukozyten an der Degradierung von Katecholaminen vermuten, wobei der Weg des Abbaus vorrangig über COMT zu verlaufen scheint.

Eine *in vitro* T-Zellaktivierung mit dem TCR-Liganden anti-CD3 mAK führte bei Leukozyten zu einem transienten Anstieg der Expression der degradierenden Enzyme, was von einer Reduktion der Noradrenalkonzentration in den Leukozyten begleitet war. Die Zunahme der Enzymexpression durch die T-Zellaktivierung konnte nicht nur bei murinen T-Lymphozyten und Leukozyten beobachtet werden, sondern darüber hinaus auch bei humanen T-Lymphozyten. Damit ist sie unabhängig von der untersuchten Spezies. Der Effekt eines Expressionsanstieges, der durch anti-CD3 mAK induziert wurde, konnte durch eine selektive Calcineurininhibition konzentrationsabhängig supprimiert werden. Somit ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem TCR-Signalweg und der Expression der degradierenden Enzyme.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die *in-vitro*-Daten auf ein Friend Virus-Infektionsmodell *in vivo* übertragen. Die *in-vivo*-Infektion von Mäusen mit dem FV führte ebenfalls zu einem Anstieg der Expression der degradierenden Enzyme, welche wiederum mit der Abnahme der Noradrenalkonzentration im Milzgewebe einherging

Die Deinnervation der lymphatischen Organe (Sympathektomie) und die dadurch bedingte Depletion des Noradrenalins in den FV-infizierten Mäusen bewirkte eine Zunahme der Splenomegalie und der Viruslast. Die Noradrenalkonzentration wurde durch die FV-Infektion in den sympathektomierten Mäusen weiter reduziert, während die Expression der synthetisierenden und degradierenden Enzyme zunahm. Auf immunologische Parameter wie Expansion der T_{regs} oder die Anzahl an zytokinproduzierenden T-Zellen hatte die FV-Infektion in den sympathektomierten Tieren keinen Einfluss.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ackerman K.D., Madden K.S., Livnat S., Felten S.Y., Felten D.L. (1991a)**
Neonatal sympathetic denervation alters the development of *in vitro* spleen cell proliferation and differentiation. Brain Behav. Immunol. 5:235-261.
2. **Ackerman K.D., Bellinger D.I., Felten S.Y., Felten D.I. (1991b)**
Ontogeny and senescence of NA innervation of the rodent thymus and spleen. in: Ader, R., Felten, D.L., Cohen, N., eds Psychoneuroimmunology, 2nd. edn San Diego: Academic Press: 71-125.
3. **Ader R., Felten D., Cohen N. (1990)**
Interactions Between the Brain and the Immune System. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 30(1): 561-602.
4. **Ader R., Cohen N. (1991)**
The influence of conditioning on immune responses. In R. Ader, D. L. Felten & N. Cohen (Eds.), Psychoneuroimmunology (pp.611–646). San Diego: Academic Press.
5. **Ader R., Cohen N. (1993)**
Psychoneuroimmunology. Conditioning and stress. Annual Review of Psychology. 44:53-85.
6. **Akimova T., Beier U. H., Wang L., Levine L.H., Hancock W.W. (2011)**
Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. PLoS ONE 6(8): e24226.
7. **Akira S., Takeda K. (2004)**
Toll-Like Receptor Signalling, Nat Rev Immunol. (7):499-511.
8. **Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. (2006)**
Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124: 783.
9. **Allman D., Sambandam A., Kim S., Miller J.P., Pagan A., Well D., Meraz A., Bhandoola A. (2003)**
Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. Nat Immunol 4(2): 168-74.
10. **Andreassi J.L., Eggleston W.B., Stewart J.K. (1998)**
Phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA in rat spleen and thymus. Neurosci Lett:241(2-3):75-8.
11. **Appel H., Gauthier L., Pyrdol J., Wucherpfennig K. W. (2000)**
Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR. Peptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. The Journal of biological chemistry 275(1): 312-21.
12. **Balogh P., Horvath G., Szakal A. K. (2004)**
Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 52(10): 1287-98.

13. **Baltrusch H.J., Stangel W., Titze I. (1991)**
Stress, cancer and immunity. New developments in biopsychosocial and psychoneuro-immunologic research. *Acta Neurol (Napoli)* 13(4):315-27.
14. **Balsa M.D., Gomez N., Unzeta M. (1989)**
Characterization of monoamine oxidase activity present in human granulocytes and lymphocytes. *Biochim Biophys Acta.* 992(2): 140-144.
15. **Banchereau J., Steinman R.M. (1998)**
Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
16. **Banks W. A. (2006)**
The blood–brain barrier in psychoneuroimmunology. *Neurol. Clin.* 24, 413–419
17. **Bao J.Y., Huang Y., Wang F., Peng Y.P., Qiu Y.H. (2007)**
Expression of alpha-AR subtypes in T lymphocytes and role of the alpha-ARs in mediating modulation of T cell function. *Neuroimmunomodulation* 14(6): 344-53.
18. **Bartik M.M., Brooks W.H., Roszman T.L. (1993)**
Modulation of T cell proliferation by stimulation of the b-adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell. Immunol.* 148:408-421.
19. **Bellinger D., Felten S. Y., Lorton D. (1996)**
Neural modulation of the immune system. In "Immunology of the Nervous System" (R. W. H. W. Keane, ed.), Oxford Univ. Press, New York.
20. **Benshop R.J., Jacobs R., Sommer B., Schurmeyer T.H., Raab J.R., Schmidt R.E., Schedlowski M. (1996)**
Modulation of the immunologic response to acute stress in humans by beta-blockade or benzodiazepines. *The FASEB journal* 10(4): 517-24.
21. **Bergquist J., Tarkowski A., Ekman R., Ewing A. (1994a)**
Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc Natl. Acad Sci USA*;91(26):12912-6.
22. **Bergquist J., Gilman S.D., Ewing A.G., Ekman R. (1994b)**
Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem.* . 1994 Oct 15;66(20):3512-8.
23. **Bergquist J., Josefsson E., Tarkowski A., Ekman R., Ewing A. (1997)**
Measurements of catecholamine-mediated apoptosis of immunocompetent cells by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 18(10)1760-1766.
24. **Besedovsky H.O., Sorkin E., Keller M., Muller J. (1975)**
Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 150, 466-470.
25. **Besedovsky H.O., del Rey A.E., Sorkin E., Da Prada M., Keller H.H. (1979)**
Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cell Immunol.* 48:346-355.

26. **Besedovsky H.O., del Rey A.E., Sorkin E. (1981)**
Lymphokine-containing supernants from ConA-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* 126:385-389.
27. **Besedovsky H.O., del Rey A.E., Sorkin E., Da Prada M., Burri R., Honegger C. (1983)**
The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Sciences* 221:564-566.
28. **Besedovsky H.O. del Rey A.E, Sorkin E, Dinarello C.A. (1986)**
Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233:652-654.
29. **Besedovsky H.O., del Rey A. (1996)**
Immuno-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*17 (1):64-102.
30. **Beutler B. (2004)**
Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845.
31. **Bhowmick S., Singh A., Flavell R.A., Clark R.B., O'Rourke J., Cone R.E. Singh A., Flavell R.A., Clark R.B., O'Rourke J., Cone R.E. (2009)**
The sympathetic nervous system modulates CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells via a TGF- β -dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 86(6):1275-8.
32. **Bidart J.M., Motte P.H., Assicot M., Bohuon C., Bellet D. (1983)**
Catechol-O-methyl-transferase activity and aminergic binding sites distribution in human peripheral blood lymphocytesubpopulations. *Clin Immunol Immunopathol.* 26(1):1-9.
33. **Blatteis C.M. (2000)**
The afferent signalling of fever. *The Journal of physiology* 526 Pt 3: 470
34. **Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M. (2001)**
Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 2001 65(2):135-72.
35. **Brown S.W., Meyers R.T., Brennan K.M., Rumble J.M., Narasimhachari N., Perozzi E.F., Ryan J.J., Stewart J.K, Fischer-Stenger K. (2003)**
Catecholamines in a macrophage cell line. *JNeuroimmunol.* 135(1-2): 47-55.
36. **Browne E.P. (2012)**
Regulation of B-cell response by Toll-like receptors. *Immunology* 136, 370-379.
37. **Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellmanns J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009)**
The MIQE Guidelines:Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:4611–622

38. **Callahan T.A., Moynihan J.A. (2002)**
Contrasting pattern of cytokines in antigen- versus mitogen-stimulated splenocyte cultures from chemically denervated mice. *Brain Behav Immun* 16:764–773.
39. **Cesta M.F. (2006)**
Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology* 34(5): 455-65.
40. **Chelmicka-Schorr E., Checinski M., Arnason B.G. (1988)**
Chemical sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* (4):347-50.
41. **Chou R.C., Stinson M.W., Noble B.K., Spengler R.N. (1996)**
Beta-adrenergic receptor regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor- α production from rats with experimental arthritis. *J Neuroimmunol* 67(1):7-16
42. **Clipstone N.A., Crabtree G.R. (1994)**
Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Ann N Y Acad. Sci.* 696:20-30.
43. **Cole S. W., Korin Y.D., Fahey J.L., Zack J.A. (1998)**
Norepinephrine accelerates HIV replication via protein kinase A-dependent effects on cytokine production. *J. Immunol.* 161:610–616.
44. **Cole S.W, Jamieson B.D, Zack JA. (1999)**
cAMP up-regulates cell surface expression of lymphocyte CXCR4: implications for chemotaxis and HIV-1 infection. *J. Immunol.* 162:1392–1400.
45. **Cole S.W., Naliboff B.D., Kemeny M.E., Griswold M.P., Fahey J.L., Zack J.A. (2001)**
Impaired response to HAART in HIV-infected individuals with high autonomic nervous system activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12695–12700.
46. **Cooper M.D., Alder M.N. (2006)**
The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 124:815-822.
47. **Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., Frigo G. (1999)**
Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci* 1999; 64(11): 975-981.
48. **Cosentino M., Bombelli R., Ferrari M., Marino F., Rasini M., Maestroni G.J., Conti A., Boveri M., Lecchini S., Frigo G. (2000)**
HPLC-ED measurement of endogenous catecholamines in human immune cells and hematopoietic cell lines. *Life Sci.* 68(3):283-295.
49. **Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Rasini E., Lecchini S., Frigo G. (2002a)**
Stimulation with phytohaemagglutinin induces the synthesis of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: role of protein kinase C and contribution of intracellular calcium. *J Neuroimmunol.* 125(1-2): 125-133.

50. **Cosentino M., Zaffaroni M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Rasini E., Lecchini S., Ghezzi A., Frigo G. (2002b)**
Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possible relevance for activation-induced apoptosis. *J. Neuroimmunol.* 133, 233-240.
51. **Cosentino M., Fietta A.M., Ferrari M., Rasini E., Bombelli R., Carcano E., Saporiti F., Meloni F., Marino F., Lecchini S.(2007)**
Human CD₄⁺CD₂₅⁺ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood.* 109(2):632-42
52. **Crabtree G.R., Clipstone N.A. (1994)**
Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. 63:1045-83.
53. **Cumano A., Godin I. (2007)**
Ontogeny of the Hematopoietic System. *Annual review of immunology* 25, 745–85
54. **Curtin N.M., Boyle N.T., Mills K.H., Connor T.J. (2009).**
Psychological stress suppresses innate IFN- γ production via glucocorticoid receptor activation: reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, Behavior and Immunity* 23(4): 535-47.
55. **D'Andrea A.D. (1992)**
The interaction of the erythropoietin receptor and gp55. *Cancer Surv* 15:19-36.
56. **Dantzer R. (2001)**
Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behavior and Immunity*, 15, 7-24.
57. **de Vries H.E., Hoogendoorn K.H., van Dijk J., Zijlstra F.J., van Dam A.M., Breimer D.D. (1995)**
Eicosanoid production by rat cerebral endothelial cells: stimulation by lipopolysaccharide, interleukin-1 and interleukin-6. *J Neuroimmunol* 59(1-2):1-8.
58. **del Rey A., Kabiersch A., Petzoldt S., Besedovsky H.O. (2003)**
Sympathetic abnormalities during autoimmune processes: potential relevance of noradrenaline-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.*992:158-67.
59. **del Rey A., Roggero E., Kabiersch A., Schäfer M., Besedovsky (2006)**
The role of noradrenergic nerves in the development of the lymphoproliferative disease in Fas-deficient, *lpr/lpr* mice. *J. Immunol.* 176(11):7079-86.
60. **del Rey A., Voigt K., Besedovsky H.O. (2007)**
Bidirektionale Kommunikation zwischen den Hormonachsen und dem Immunsystem. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen.* Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht.

61. **del Rey A., Wolff C., Wildmann J., Randolph A., Hahnel A., Besedovsky H.O., Straub R.H. (2008)**
Disrupted brain-immune system-joint communication during experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 58(10):3090-9.
62. **DeLarco J., Todaro G.J. (1976)**
Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp71. *Cell* 8:365-71.
63. **Depelchin A., Letesson J.J. (1981)**
Adrenaline influence on the immune response. I. Accelerating or suppressor effects according to the time of application. *Immunol. Lett.* 3: 199-205.
64. **Di Comite G., Grazia Sabbadini M., Corti A., Rovere-Querini P., Manfredi A.A. (2007)**
Conversation galante: How the immune and the neuroendocrine systems talk to each other. *7(1):23-9.*
65. **Dimitrov S., Lange T., Born J. (2010)**
Selective Mobilization of Cytotoxic Leukocytes by Epinephrine. *Journal of Immunology* 184(1): 503-11.
66. **Dittmer U., Race B., Peterson K.E., Stromnes I.M., Messer R.J., Hasenkrug K.J. (2002)** Essential Roles for CD8⁺ T cells and Gamma Interferon in Protection of Mice against Retrovirus-Induced Immunosuppression. *J Virol* 76:450-4.
67. **Eisenhofer G., Cox H.S, Esler M.D. (1990)**
Paralle increases in noradrenaline reuptake and release into plasma during activation of the sympathetic nervous system in rabbits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 342: 328–335.
68. **Eisenhofer G., Esler M.D., Meredith I.T, Ferrier C., Lambert G., Jennings G. (1991)**
Neuronal re-uptake of noradrenaline by sympathetic nerves in humans. *Clin Sci* 80: 257–263.
69. **Eisenhofer G., Lenders J.W. (1998)**
Clues to the diagnosis of pheochromocytoma from the differential tissue metabolism of catecholamines. *Adv Pharmacol* 42: 374–377.
70. **Eisenhofer G., Kopin I.L., Goldstein D.D. (2004)**
Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev.* 56, S. 331-349.
71. **Elenkov I.J., Wilder R. L., Chrousos G.P., Vizi E.S. (2000)**
The Sympathetic Nerve--An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and The Immune System. *Pharmacological reviews* 52(4): 595-638.
72. **Elenkov I.J. (2008)**
Effects of Catecholamines on the Immune Response. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis.* Elsevier B.V.189-206

73. **Engler H., Dawils L., Hoves S., Kurth S., Stevenson J.R., Schauenstein K., Stefanski V. (2004)**
Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of α - and β -adrenergic mechanisms. *Journal of Neuroimmunology* 156(1-2): 153-62.
74. **Felten D.L., Livnat S., Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L., Yeh O. (1984)**
Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain res. Bull.* 13, 693-699.
75. **Felten D.L., Felten S.Y., Carlson S.L., Olschowka J.A., Livnat S. (1985)**
Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immun.* 135; 7550-7650.
76. **Felten S.Y., Olschowka J. (1987a).**
Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptic-like contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. *J Neurosci Res* 18:37-48.
77. **Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger, D.L., Carlson S.L., Ackerman K.D., Madden K.S., Olschowki J.A., Livnat S. (1987b)**
Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 100: 225-60
78. **Felten D.L., Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L., Ackerman K.D., Romano T.A., Livnat S. (1988)**
Development, aging and plasticity of noradrenergic sympathetic innervation of secondary lymphoid organs: implications for neural – immune interactions. *Cate. Research Part A: Basic aspects and peripheral mechanisms* Alan R. Loss. New York.
79. **Felten S.Y., Felten D.L. (1991)**
Innervation of lymphoid tissue. *Psychoneuroimmunology-II*. San Diego: Academic.
80. **Felten S.Y., Felten D.L. (1994)**
Neural-Immune interactions. *Progress in Brain Research* 100.157-62.
81. **Feng Z., Angeletti R.H., Levin B.E. Sabban E.L.(1992)**
Glycosylation and Membrane Insertion of Newly Synthesized Rat Dopamine β -hydroxylase in a Cell-free System without Signal Cleavage. *J Biol Chem.* 267(30):21808-15.
82. **Feske S., Okamura H., Hogan P.G., Rao A. (2003)**
 Ca^{2+} /calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochem Biophys Res Commun. Biochem Biophys Res Commun.* 311(4):1117-32.
83. **Fernandez E.J., Lolis E. (2002)**
Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:469-99.
84. **Fleer A., Krediet T.G. (2007)**
Innate Immunity: Toll-Like Receptors and some more. *Neonatology.* 92: 145-157.

85. **Flierl M.A., Rittirsch D., Nadeau B.A., Chen A.J., Sarma J.V., Zetoune F.S., McGuire S.R., List R.P., Day D.E., Hoesel L.M., Gao H., van Rooijen N., Huber-Lang M.S., Neubig R.R., Ward P.A. (2007)**
Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature*. 449(7163):721-5.
86. **Flierl M.A., Rittirsch D., Huber-Lang M.S., Sarma J.V., Ward P.A. (2008).**
Catecholamines-Crafty weapons in the inflammatory Arsenal of Immune/Inflammatory Cells or Opening Pandora's Box? *Mol Med*. 14:195-204.
87. **Flierl M.A., Rittirsch D., Nadeau B.A., Sarma J.V., Day D.E., Lentsch A.B., Huber-Lang M.S., Ward P.A. (2009)**
Upregulation of Phagocyte-Derived Catecholamines Augments the Acute Inflammatory Response. 4(2):e4414
88. **Frank M.M., Fries L.F. (1991)**
The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today* 12: 322.
89. **Freeman J.G., Ryan J.J., Shelburne C.P., Bailey D.P., Bouton L.A., Narasimhachari N., Domen J., Siméon N., Couderc F., Stewart J.K. (2001)**
Catecholamines in murine bone marrow derived mast cells. *J. of Neuroimm.* 119: 231-238
90. **Friend C. (1957)**
Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* 105:307-18.
91. **Fuchs B.A., Campell K.S., Munson A.E. (1988)**
 β -Adrenergic receptors on murine lymphocytes: Density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. *Cell Immunol*. 114(2):231-45.
92. **Giubilei F., Antonini G., Sepe-Monti M., Tisei P., Brunetti E., Marchione F., Caronti B., Pontieri F. E. (2004)**
Increased Lymphocyte Dopamine β -hydroxylase Immunoreactivity in Alzheimer's Disease: Compensatory Response to Cholinergic Deficit? *Dement Geriatr Cogn Disord*. 18(3-4):338-41
93. **Glinka Y., Gassen M., Youdim M.B. (1997)**
Mechanism of 6-Hydroxydopamine Neurotoxicity. *J.Neural Transm.Suppl*: 50: 55-66.
94. **Gordon S. (2002)**
Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
95. **Graf T. (2008)**
Immunology: blood lines redrawn. *Nature* 452: 702.
96. **Grebe K.M., Hickman H.D., Irvine K.R., Takeda K., Bennick J.R., Yewdell J.W. (2009)**
Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8⁺ T-cell response. *PNAS*. 16:5300-5305.

97. **Grebe K.M., Takeda K., Hickman H.D., Bailey A.M., Embry AC., Bennick J.R., Yewdell J.W. (2010)**
Cutting Edge: Sympathetic Nervous System Increases Proinflammatory Cytokines and Exacerbates Influenza A Virus Pathogenesis. *J Immunol.* 184(5):2736.
98. **Hall N.R., McClure J.E., Hu S.K. Tare N.S., Seals C.M., Goldstein A.L. (1982)**
Effects of 6-hydroxydopamine upon primary and secondary thymus dependent immune responses. *Immunopharmacology.* (1): 39-48
99. **Hasenkrug K.J., Dittmer U. (2007)**
Immune control and prevention of chronic Friend retrovirus infection. *Front Biosci.*12:1544-51.
100. **Hasko G. (2001)**
Receptor-mediated interaction between the sympathetic nervous system and immune system in inflammation. *Neurochem Res* 26(8-9):1039-44.
101. **Hatfield S.M., Petersen B.H., DiMicco J.S. (1986)**
 β -adrenoceptor modulation of the generation of murine cytotoxic T lymphocytes *in vitro*. 239(2):460-6.
102. **Härle P., Möbius D., Carr D.J., Schölmerich, J., Straub, R.H.(2005)**
An opposing timedependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 52(4), 1305-1313.
103. **Hellstrand K., Hermodsson S., Strannegard O. (1985)**
Evidence for a β -adrenoceptomediated regulation of human natural killer cells. *J Immunol.* 134: 4095-99.
104. **Ho S., Clipstone N., Timmermann L., Northrop J., Graef I., Fiorentino D., Nourse J., Crabtree G.R. (1996)**
The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 80 (3 Pt 2): S 40-5. *Clin Immunol Immunopathol.* 80(3 Pt 2):S40-5.
105. **Hoebe K., Beutler B. (2004)**
The interface between innate and adaptive immunity. *Nature Immunology* 5(10): 971-974.
106. **Iwasaki A., Medzhitov R. (2004)**
Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5:987-995.
107. **Janeway C.A., Medzhitov R. (2002)**
Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20: p. 197-216.
108. **Janeway C.A. (2005)**
Immunobiology : the immune system in health and disease; [CD-ROM inside ; animations, videos and figures from the book], 6. edn. Garland Science, New York [u. a.]
109. **Jiang J.L., Qiu Y.H., Peng Y.P., Wang J.J. (2006)**
Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells. *Sheng Li Xue Bao.*58(4):309-17.

110. **Jiang J.L., Peng Y.P., Qiu Y.H., Wang J.J. (2009)**
Adrenoreceptor-coupled signal-transduction mechanisms mediating lymphocyte apoptosis Induced by endogenous catecholamines. *J. of Neuroimmun.* 213, 100-111.
111. **Josefsson E., Bergquist J., Ekman R., Tarkowski A. (1996)**
Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunology.* 88(1): 140-146.
112. **Juruena M.F., Cleare A.J., Pariante C.M. (2004)**
The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 26(3), 189-201.
113. **Kabat D. (1989)**
Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 148:1-42.
114. **Kam C.M., Hudig D., Powers J.C. (2000)**
Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochem Biophys Acta.* 1477(1-2):307-23.
115. **Katz P., Zayton A.M., Fauci A.S. (1982)**
Mechanisms of human cell-mediated cytotoxicity. I. Modulation of natural killer cell activity by cyclic nucleotides. *J Immunol.* 129: 287-96.
116. **Kelley K.W., Bluthé R.M., Dantzer R., Zhou J.H., Shen W.H., Johnson R.W., Broussard S.R. (2003)**
Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behav. Immun.,* 17, 112-118.
117. **Khan M.M., Sansoni P., Silverman E.D., Engleman E.G., Melmon K.L. (1986)**
 β -adrenergic receptors on human suppressor, helper and cytolytic lymphocytes. *Biochem. Pharmacol* 35:1137-1142.
118. **Kimbrell D. A., Beutler B. (2001)**
The evolution and genetics of innate immunity. *Nature Rev. Genet.* 2:256.
119. **Kin N.W., Sanders V.M. (2006)**
It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol.* 79(6):1093-104.
120. **Kitchen R.R., Kubista M., Tichopad A. (2010)**
Statistical aspects of quantitative real-time PCR expressed design. *Methods* 50:231-236.
121. **Kobilka B.K. (1991)**
Molecular approaches to the study of adrenergic receptors. In *Advances in Regulation of Cell Growth*, ed. JJ Mond, JC Chambier, A Weiss, 2:161-70. New York: Raven.
122. **Kobilka B. (1992)**
Adrenergic receptors as models for G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.* 15:87-114.

123. **Koff W.C., Fann A.V., Dunegan M.A., Lachman L.B. (1986)**
Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production. *Lymphokine Res* 5(4):239-47.
124. **Kohm A.P., Sanders V.M. (1999)**
Suppression of Antigen-Specific Th2 Cell-Dependent IgM and IgG1 Production Following Norepinephrine Depletion *in vivo*. *J Immunol.*; 162(9):5299-308.
125. **Kohm A.P. Sanders V.M. (2000)**
Norepinephrine: A messenger from the brain to the immune system. *Immunol. Today* 21,539-542.
126. **Konig R., Huang L.Y., Germain R.N. (1992)**
MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356: 796.
127. **Koussi E., Li Y.S., Boukhris W., Millet I., Revillard J.P. (1988)**
Opposite effects of the catecholamines dopamine and norepinephrine on the murine polyclonal B-cell activation. *Immunopharmacology*. 16: 125-37.
128. **Knudsen J.H., Christensen N.J., Bratholm P. (1996)**
Lymphocyte norepinephrine and epinephrine, but not plasma catecholamines predict lymphocyte cAMP production. *Life*. 59(8): 639-647.
129. **Krauss G. (2008)**
Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 4th enlarged and improved Edition ed
130. **Kruszewska B., Felten S.Y., Moynihan J.A. (1995)**
Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy two strains of mice. *J. Immunol*. 155, 4613–4620.
131. **Kumer S.C., Kent E.V. (1996)**
Intricate Regulation of Tyrosine Hydroxylase Activity and Gene Expression. *J. Neurochem*. 67,443-462.
132. **Kvetnansky R., Sabbanek EL., Palkovits. (2009)**
Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol Rev* 89: 535–606
133. **Landmann R., Bittiger H., Buhler FR. (1981)**
High affinity beta-2-adrenergic receptors in mononuclear leucocytes: similar density in young and old subjects. *Life Sci*. 29:1761-71.
134. **Leo N.A., Callahan T.A., Bonneau R.H. (1998)**
Peripheral sympathetic denervation alters both the primary and memory cellular immune responses to herpes simplex virus infection. *Neuroimmunomodulation* 5, 22–35.
135. **Leo N.A., Bonneau R.H. (2000)**
Mechanisms underlying chemical sympathectomy-induced suppression of herpes simplex virus-specific cytotoxic T lymphocyte activation and function. *Journal of Neuroimmunology* 110. 45–56.

136. **Lewis E.J., Asnani L.P. (1992)**
Soluble and Membrane-bound forms of Dopamine β -hydroxylase are encoded by the same mRNA. J Biol. Chem. 267(1):494-500.
137. **Livnat S., Felten S.Y., Carlson S.L., Bellinger D.L., Felten D.L. (1985)**
Involvement of peripheral and central catecholamine systems in neural-immune interactions. J Neuroimmunol. 10(1):5-30.
138. **Mackay C.R., Marston W.L., Dudley L. (1990)**
Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. J Exp Med 171:801-817.
139. **Madden K.S., Felten S.Y., Felten D.L., Sundaresan P.R., Livnat S. (1989)**
Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity *in vivo* and *in vitro* following chemical sympathectomy. Brain Behav. Immun. 3, 72-89.
140. **Madden K.S., Felten S.Y., Felten D.L., Hardy C.A., Livnat S. (1994a)**
Sympathetic nervous system modulation of the immune system: II. Induction of lymphocyte proliferation and migration *in vivo* by chemical sympathectomy. J Neuroimmunol. 49: 67-75.
141. **Madden K.S., Moynihan J.A., Brenner G.J., Felten S.Y., Felten D.L., Livnat S. (1994b)**
Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation *in vitro* following chemical sympathectomy. J. Neuro- immunol. 49, 77-87.
142. **Madden K.S., Sanders V.M., Felten D.L. (1995)**
Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu Rev Pharmacol Toxicol 35: 417-48.
143. **Marino F., Cosentino M., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., Frigo G. (1999)**
Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage, and uptake in human peripheral blood mononuclear cells. Exp. Hemat. 27. 489-495.
144. **Marino F., Cosentino M. (2011)**
Adrenergic modulation of immune cells: an update. Amino Acids.
145. **Medzhitov R. (2007)**
Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449:819-826.
146. **Meisel C., Schwab J.M., Prass K., Meisel A., Dirnagl U. (2005)**
Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. Nat. Rev. Neurosci. 6. (10):775-86
147. **Meuer S.C., Hodgdon J.C., Hussey R.E., Protentis J. P., Schlossman S. F., Reinherz E. L. (1983)**
Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones. The Journal of experimental medicine 158(3): 988-93.

148. **Mignini F., Strecciconi V, Amenta F. (2003)**
Autonomic innervation of immune organs and neurimmune modulation. *Auton. Autacoid. Pharmacol.* 23:1-25.
149. **Miura T., Kudo T., Matsuki A., Sekikawa K., Tagawa Y., Iwakura Y., Nakane A. (2001)**
Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun.*(12):7234-41.
150. **Molinoff P.B., Axelrod J. (1971)**
Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem.* 40:465-500.
151. **Moreau-Gachelin F., Tavitian A., Tambourin P. (1988)**
Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. *Nature* 331: 277.
152. **Moreau-Gachelin F. (2008)**
Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology* 5: 99.
153. **Moynihan J., Kruszeska B., Callahan T. (2004)**
Sympathetic nervous system regulation of immunity. *J Neuroimmunol.* (1-2):87-90.
154. **Muller U., Vogel P., Alber G., Schaub G.A. (2008)**
The innate immune system of mammals and insects. *Contrib Microbiol* 15:21-44.
155. **Murphy K.M, Reiner S.L. (2002)**
The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
156. **Nair S., Bayer W., Ploquin M.J., Kassiotis G., Hasenkrug K.J. Dittmer U. (2011)**
Distinct roles of CD4⁺ T cell subpopulations in retroviral immunity: lessons from the Friend virus mouse model. *Retrovirology*26; 8:76.
157. **Nappi A.J., Ottaviani, E. (2000)**
Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bio Essays* 22, 469– 480.
158. **Neuhuber W. (2004)**
Autonomes Nervensystem. In: Benninghoff A, Drenckhahn D, (Hrsg.). *Anatomie*, Band 2. München: Elsevier GmbH; 595-614.
159. **Noelle R.J., Roy M., Shepherd D.M., Stamenkovic I., Ledbetter J.A., Aruffo A. (1992)**
A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6550-6554.
160. **Ouellette A.J.(2004)**
Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:405-419.
161. **Pal E., Tabira T. (2002)**
Autonomic regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: the role of interferon-gamma. *Neuroimmunomodulation* 10(2), 80-84

162. **Palkowitsch L., Marienfeld U., Brunner C. , Eitelhuber A., Krappmann D, Marienfeld R.B. (2011)**
The Ca^{2+} -dependent Phosphatase Calcineurin Controls the Formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 Complex during T Cell Receptor-induced NF- κ B Activation. The Journal of Biology chemistry Vol 286, NO. 9, pp. 7522–7534.
163. **Pariente C.M., Miller A.H. (2001)**
Glucocorticoid receptors in major depression:relevance to pathophysiology and treatment. Biol Psychiatry;49(5):391-404.
164. **Parnes J.R (1989)**
Molecular biology and function of CD4 and CD8. Adv Immunol 44:265-311.
165. **Qiu Y.H., Peng Y.P., Jiang J.M., Wang J.J. (2004)**
Expression of tyrosine hydroxylase in lymphocytes and effect of endogenous catecholamines on lymphocyte function. Neuroimmunomodulation. 11(2): 75-83.
166. **Qiu YH., Cheng C., Dai L., Peng YP. (2005)**
Effect of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. J Neuroimmunol. 167(1-2): 45-52.
167. **Quan N., Whiteside M., Herkenham M. (1998)**
Time course and localization patterns of interleukin-1 α messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. Neuroscience 83, 281–293 (1998).
168. **Raison C.L., Gurnick J.F., Miller A.H., (2002)**
Neuroendocrine-Immune Interactions: Implications for Health and Behavior. Hormones, Brain and Behaviour. Volumen 5.
169. **Ranabir S., Reetu K. (2011)**
Stress and hormones. Indian J Endocrinol Metab. (1):18-22.
170. **Rao A. (1995)**
NFATp, a cyclosporin-sensitive transcription factor implicated in cytokine gene induction. J Leukoc Biol.. 57(4):536-42.
171. **Reder A., Checinski M., Chemicka-Schorr E. (1989)**
The effect of chemical sympathectomy on natural killer cells in mice. Brain Behav Immun.(2):110-8.
172. **Reinhardt R.L., Kang S.J., Liang H.E., Locksley R.M. (2006)**
T helper cell effector fates--who, how and where? Curr Opin Immunol 18:271-277.
173. **Rice P.A., Boehm G.W., Moynihan J.A., Bellinger D.L., Stevens S. (2002)**
Chemical sympathectomy increases numbers of inflammatory cells in the peritoneum early in murine listeriosis. Brain Behav Immun 16:654–662.
174. **Riether C., Kavelaars A., Wirth T., Pacheco-Lopez G., Doenlen R., Willemsen H., Heijnen C. J., Schedlowski M., Engler H. (2011)**
Stimulation of beta-adrenergic receptors inhibits calcineurin activity in CD4(+) T cells via PKA-AKAP interaction. Brain, Behavior and Immunity 25(1): 59-66.

175. **Roan Y., Galant S.P. (1982)**
Decreased Neutrophil β -Adrenergic Receptors in the Neonate *Pediatr. Res.* 16: 591-593.
176. **Rockman H.A., Koch W., Lefkowitz R.J. (2002)**
Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature.* 415:206-212.
177. **Roggero E., Wildmann J., Passerini M.O., del Rey A., Besedovsky H.O. (2012)**
Different peripheral neuroendocrine responses to *Trypanosoma cruzi* infection in mice lacking adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 62(1):37-44.
178. **Romeo H.E., Tio D.L., Rahman S.U., Chiappelli F., Taylor A. N. (2001)**
The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. *J. Neuroimmunol.* 115, 91–100.
179. **Rontgen P., Sablotzki A., Simm A., Silber R. E., Czeslick, E. (2004)**
Effect of catecholamines on intracellular cytokine synthesis in human monocytes. *European Cytokine Network* 15(1): 14-23.
180. **Saito, H., Yokoi, Y., Watanabe, S., Tajima, J., Kuroda, H., Namihisa, T. (1988)**
Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *The American journal of anatomy* 181(3): 235-52
181. **Sanders V.M., Baker R.A., Ramer-Quinn D.S., Kasprowicz D.J., Fuchs B.A., Street N.E. (1997)**
Differential expression of the β_2 - adrenergic receptor by Th1 and Th2 clones: Implications for cytokine production and B cell held. *J. Immunol* 158: 4200-4210.
182. **Sanders V.M., Straub R.H. (2002)**
Norepinephrine, the β -adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 16(4): 290-332.
183. **Schauenstein K., Liebmann P. (2006)**
Aus Straub R.H. *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen.*
184. **Schedlowski M., Hosch W., Oberbeck R., Benschop R.J., Jacobs R., Raab H.R., Schmidt R.E. (1996)**
Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *Journal of Immunology* 156(1): 93-9.
185. **Schober A. (2004)**
Classic Toxin-Induced Animal Models of Parkinson's Disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318(1): 215-224;
186. **Schorr E.C., Arnason B. G. (1999)**
Interactions between the sympathetic nervous system and the immune system. *Brain Behav Immun* 13(4): 271-8.
187. **Seger R., Krebs E. (1995)**
The MAPK signaling cascade. *FASEB J. Bd.* 9, S. 726-735.

188. **Seruga B., Zhang H., Lori J. Bernstein L.J., Tannock I.F. (2008)**
Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer, *Nat Rev Cancer*.(11):887-99.
189. **Severn A., Rapson N.T., Hunter C.A., Liew FY. (1992)**
Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and b-adrenergic agonists. *J. Immunol*.148: 3341-45.
190. **Shannon J.R., Flattem N.L., Jordan J. (2000)**
Orthostatic intolerance and tachycardia associated with norepinephrine-transporter deficiency. *N Engl J Med*.342:541-549.
191. **Shih J.C., Chen K. (2004)**
Regulation of MAO-A and MAO-B gene expression. *Curr Med Chem*.(15):1995-2005.
192. **Sloan E.K., Tarara R.P., Capitanion J.P., Cole S.W. (2006)**
Enhanced Replication of Simian Immunodeficiency Virus Adjacent to Catecholaminergic Varicosities in Primate Lymph Nodes. *J. Virol*. 80(9):4326.
193. **Spengler R.N., Chensue S.W., Giacherio D.A., Blenk N., Kunkel S.L. (1994)**
Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages *in vitro*. *J Immunol*. 1994 Mar 15;152(6):3024-31.
194. **Steiniger B., Barth P. (2000)**
Microanatomy and function of the spleen. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* 151: III-IX, 1-101.
195. **Steinman R.M, Hemmi H. (2006)**
Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 311: 17
196. **Strasser R.H., Ihl-Vahl R., Marquetant R. (1992)**
Molecular Review, Molecular biology of adrenergic receptors. *J Hypertens*.10: 501-506.
197. **Straub R.H., Besedovsky H.O., del Rey A. (2007)**
Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen*, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht.
198. **Straub R.H., Rauch L., Fassold A., Lowin T. & Pongratz, G. (2008)**
Neuronally released sympathetic neurotransmitters stimulate splenic interferon-gamma secretion from T cells in early type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008, 58(11), 3450-3460.
199. **Swanson M.A., Lee W.T., Sanders V.M. (2001)**
IFN- γ Production by Th1 Cells Generated from Naive CD4⁺ T cells Exposed to Norepinephrine. *Journal of Immunology* 166(1): 232-40.

- 200. Takayama H., Trenn G., Sitkowsky M.V. (1988)**
Locus of inhibitory action of cAMP dependent protein kinase in the antigen receptor triggered cytotoxic T lymphocyte activation pathway. *J Biol Chem.* 263: 2330-36.
- 201. Takeda K., Akira S. (2005)**
Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology.* Vol.17, No. 1, pp. 1–14.
- 202. Tchivileva I.E., Nackley A.G., Qian L., Wentworth S., Conrad M., Diatchenko L.B. (2009)**
Characterization of NF-kB-mediated inhibition of catechol-*O*-methyltransferase. *Mol Pain.* 5:13.
- 203. Tsigos C., Chrousos G.P. (1994)**
Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23(3):451-66.
- 204. Templeton A., Nguyen G., Ash J.D., Straub R.H., Carr D.J.J. (2008)**
Chemical sympathectomy increases susceptibility to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J of Neuroimm.* 197-37-46.
- 205. Thoenen H., Tranzer, J.P. (1968)**
Chemical Sympathectomy by Selective Destruction of Adrenergic Nerve Endings With 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp.Pathol.Pharmakol.:* 261(3): 271-288.
- 206. Turnbull A.V., Rivier C.L. (1999)**
Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79(1):1-71.
- 207. van Lier R.A., Brouwer M., Rebel V. I., van Noesel C. J., Aarden L. A. (1989)**
Immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies induce accessory cell-independent lymphokine production, proliferation and helper activity in human T lymphocytes. *Immunology* 68(1): 45-50.
- 208. van Tits L.J., Michel M. C., Grosse-Wilde H., Happel M., Eigler F. W., Soliman A., Brodde, O. E. (1990)**
Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via a beta 2-adrenergic, spleen-dependent process. *Am J Physiol* 258(1 Pt 1): E191-202.
- 209. Wang J., Shao Y., Bennett T.A., Shankar R.A., Wightman P.D., Reddy L.G. (2006)**
The Functional Effects of Physical Interactions among Toll-like Receptors 7, 8, and 9. *J. Biol.Chem.* 281:37427.
- 210. Weihe E., Krekel J. (1991)**
The neuroimmune connection in human tonsils. *Brain, Behavior and Immunity.* 5:41-54.

211. **Westly H.J., Molinoff P.B. (1994)**
Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. PP. 261-281 Raven press.
212. **Williams J.M., Felten D.L. (1981)**
Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: A comparative histofluorescence study. Anat Rec 199:531–542.
213. **Wilder R.L. (1995)**
Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. Annu Rev Immunol.13:307-38.
214. **Zelinskyy G., Dietze K.K., Hüsecken Y.P., Schimmer S., Nair S., Werner T., Gilbert K., Kershaw O., Gruber A.D., Sparwasser T., Dittmer U. (2009)**
The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response.Blood. 114(15):3199-207
215. **Zinkernagel RM, Doherty PC. (1974)**
Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248: 701

Danksagung

"Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten".

Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten".

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Expression von Enzymen für die Synthese und die Degradierung von Katecholaminen in Immunzellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Sina Mollé-
rus befürworte.

Essen, den _____
Harald Engler

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Sina Mollé-
rus

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat. dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
Sina Mollé-
rus